

# **Charakterisierung und funktionelle Bedeutung der BTLA-HVEM-Interaktion für die Immunantwort**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biochemikerin Stephanie Gurka

geboren am 25.01.1979 in Cottbus

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Markschies

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Radbruch  
2. Prof. Dr. Richard A. KroczeK  
3.. Dr. Michal Or-Guil

Tag der mündlichen Prüfung: 09.09.2009



- *Meinen Eltern* -





## Zusammenfassung

Interaktionen zwischen Zellen und auch deren Aktivierung werden im Immunsystem durch verschiedene Zelloberflächenmoleküle reguliert. Inhalt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des kürzlich identifizierten Rezeptor-Ligand-Paares BTLA und HVEM.

Zunächst wurden diverse BTLA-spezifische monoklonale Antikörper generiert, mit deren Hilfe erstmals die Lokalisation BTLA-tragender Zellen im Gewebe gezeigt werden konnte. Bei umfassenden Expressionsanalysen fiel auf, dass BTLA auf nahezu allen Leukozytenpopulationen der lymphatischen Organe konstitutiv vorhanden ist, und mit seinem Liganden HVEM ko-exprimiert wird. Beide Interaktionspartner werden auf verschiedenen Zellpopulationen differenziell exprimiert und darüber hinaus auch aktivierungsabhängig reguliert. Funktionelle Analysen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (in einem antigenspezifischen adoptiven Transfersystem) haben ergeben, dass die BTLA-HVEM-Interaktion durch Suppression der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen wesentlich zur negativen Regulation der Immunantwort beiträgt. Die negative Wirkung von BTLA zeigte sich sowohl bei der Initiation als auch bei einer bereits fortgeschrittenen Aktivierung, unabhängig davon ob andere positive kostimulatorische Signalwege (z.B. CD28) beteiligt waren. Durch Stimulation von T-Zellen mit unterschiedlicher BTLA-Oberflächenexpression (verschiedene Subpopulationen oder aus transgenen Mäusen) konnte die strikte Korrelation der negativen Funktion mit der BTLA-Menge auf den Zellen gezeigt werden. Weiterhin stellte sich heraus, dass BTLA essentiell für die HVEM-vermittelte Suppression ist und eine wesentliche Beteiligung weiterer HVEM-Interaktionspartner (z.B. CD160) nicht vorliegt. Die Beobachtung von veränderten Lymphozytenpopulationen in den transgenen BTLA-Mäusen im Ruhezustand weist außerdem auf einen zentralen Beitrag des negativen BTLA-Signals zur Aufrechterhaltung der Homöostase hin.

Die ubiquitäre Expression von HVEM und BTLA in Kombination mit der gegenseitigen Modulation beider Interaktionspartner ermöglicht eine flexible Reaktion des Immunsystems auf äußere Einflüsse unter anderem über die negative Regulation durch BTLA.

**Schlagnworte:** BTLA, HVEM, monoklonale Antikörper, Expressionsanalyse, Kostimulation, Inhibition, Modulation



## Abstract

Activation of immune cells is regulated by a number of cell surface molecules during cell-cell interactions. The aim of this work was the characterization of the recently identified surface receptor-ligand-pair BTLA and HVEM.

Initially, several BTLA-specific monoclonal antibodies were generated. With these antibodies, the localization of BTLA expressing cells in the tissues has been determined for the first time, moreover this enabled the extensive analysis of BTLA tissue distribution on protein level. Further detailed analysis using flow cytometry revealed a strong constitutive expression of BTLA on nearly all leukocyte populations in lymphoid organs. Interestingly, on all BTLA-expressing cells co-expression of its ligand HVEM was observed. However, both interaction partners were differentially expressed on different cell populations in the steady state, but were also regulated in an activation-dependent way. Functional analyses both *in vitro* and *in vivo* (in an antigen-specific adoptive transfer system) revealed a substantial contribution of the BTLA-HVEM interaction for negative regulation of immune responses by suppressing the activation as well as proliferation of T cells. Inhibitory signals of BTLA affect the initial and an ongoing activation, irrespective of simultaneous positive signals from other costimulatory pathways. Using wildtype and different BTLA-transgenic primary T cells, a strictly linear relationship between the inhibitory function of BTLA and its cell surface levels was observed. However, BTLA expression determined not only the strength of HVEM-mediated suppression, but the data also clearly demonstrate that BTLA is essential for this negative co-stimulation, whereas other HVEM-interaction partners were apparently not involved. Finally, the observed changes in lymphoid cell populations of the BTLA-transgenic mice even in the resting state indicate a prominent role for negative BTLA signals to maintain homeostasis. The ubiquitous expression of HVEM and BTLA together with the reciprocal modulation of both interaction partners supports flexible reaction and regulation of the immune system particularly via the inhibitory function of BTLA.

**Keywords:** BTLA, HVEM, monoclonal antibodies, expression analysis, costimulation, inhibition, modulation



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 TNF/TNFR-Superfamilie.....	3
1.2 B7/CD28-Superfamilie .....	4
1.3 Kostimulatorische Rezeptoren regulieren verschiedene Phasen der T-Zellantwort .....	5
1.4 Kostimulatorische Moleküle werden auf verschiedenen Zellen exprimiert.....	6
1.5 Präferenz für kostimulatorische Signalwege in CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	7
1.6 Komplexe Netzwerke kostimulatorischer Signalwege .....	8
1.7 Aufgabenstellung .....	11
<b>2 Material/Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien.....	12
2.2 Tiere .....	12
2.3 Monoklonale Antikörper .....	13
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	14
2.4.1 Isolierung von RNA .....	14
2.4.2 Klonierung von murinem BTLA und HVEM.....	14
2.4.3 Transformation in E. coli und Plasmidpräparation.....	15
2.4.4 RNA Dot-Blot .....	15

2.4.5	Real-Time-quantitative PCR.....	16
<b>2.5</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.5.1	Puffer .....	17
2.5.2	Zellkulturmedien .....	17
2.5.3	Kultivierung von Zelllinien .....	17
2.5.4	Präparation primärer Zellen.....	18
2.5.5	Durchflusszytometrie.....	18
2.5.6	Anreicherung von T-Zellen über Nylonwolle.....	20
2.5.7	Magnetische Zellsortierung .....	21
2.5.8	<i>In vitro</i> Stimulation von T- und B-Zellen.....	21
2.5.9	Proliferationsanalyse .....	22
<b>2.6</b>	<b>Transfektion eukaryotischer Zelllinien.....</b>	<b>22</b>
2.6.1	Murine Zelllinien.....	22
2.6.2	Drosophila Zelllinie .....	23
2.6.3	Selektion von HVEM-Fusionsproteinproduzenten.....	24
2.6.4	Reinigung von HVEM-huIgG1 aus dem Zellkulturüberstand .....	24
<b>2.7</b>	<b>Herstellung monoklonaler Antikörper gegen BTLA .....</b>	<b>25</b>
2.7.1	Immunisierung.....	25
2.7.2	Fusion .....	26
2.7.3	Screening der Hybridome .....	27
2.7.4	Kultivierung und Subklonierung von Hybridomen .....	27
2.7.5	Reinigung der monoklonalen Antikörper .....	27
2.7.6	Isotypbestimmung der mAK.....	28
2.7.7	F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente .....	28
<b>2.8</b>	<b>Immunhistochemie (IHC) .....</b>	<b>28</b>
2.8.1	Gewebepräparation, Kryoschnitte und Fixierung .....	28
2.8.2	POD-Färbung .....	29
<b>2.9</b>	<b>Tierexperimentelle Methoden.....</b>	<b>30</b>
2.9.1	Adoptiver Zelltransfer .....	30
2.9.2	Immunisierung.....	30
<b>2.10</b>	<b>Statistische Analysen.....</b>	<b>30</b>

<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Herstellung von Reagenzien zur Charakterisierung des BTLA-Moleküls .....</b>	<b>31</b>
3.1.1	Generierung von BTLA-exprimierenden Zelllinien .....	31
3.1.2	Generierung eines HVEM-Fusionsproteins.....	32
3.1.3	Generierung von monoklonalen anti-BTLA Antikörpern.....	33
3.1.4	Charakterisierung der anti-BTLA Antikörper.....	35
<b>3.2</b>	<b>Analyse der BTLA-Expression.....</b>	<b>40</b>
3.2.1	BTLA ist in lymphatischen Organen exprimiert .....	40
3.2.2	BTLA ist konstitutiv auf Zellen des Immunsystems exprimiert.....	43
3.2.3	Die BTLA-Expression ändert sich während der Lymphozytendifferenzierung .....	45
3.2.4	Nach Lymphozytenaktivierung wird die BTLA-Expression differenziell reguliert .....	47
<b>3.3</b>	<b>Analyse lymphatischer Zellpopulationen von Mäusen mit genetisch verändertem BTLA-Niveau.....</b>	<b>52</b>
3.3.1	Veränderungen im BTLA-HVEM System wirken sich bereits im Ruhezustand auf Zellpopulationen der lymphatischen Organe aus.....	53
3.3.2	Durch Veränderung des BTLA-Ausgangsniveaus wird die initiale T-Zellaktivierung nicht beeinflusst.	57
<b>3.4</b>	<b>Funktionelle Relevanz des BTLA-HVEM Systems für die negative Modulation der T-Zellaktivierung.....</b>	<b>60</b>
3.4.1	Durch HVEM wird ein starkes negatives Signal für die T-Zellaktivierung übermittelt .....	60
3.4.2	Die HVEM vermittelte Inhibition der T-Zellaktivierung ist auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen stärker ausgeprägt .....	62
3.4.3	Die HVEM-vermittelte T-Zellsuppression ist abhängig vom TZR-Signal und erfolgt auch in Anwesenheit starker positiver Signale .....	63
3.4.4	Der inhibitorische Effekt von HVEM ist abhängig von der BTLA-Expressionsstärke.....	64
3.4.5	Potentielle Rolle anderer HVEM-Liganden bei der Suppression der T-Zellaktivierung .....	68
3.4.6	Von HVEM vermittelte Signale supprimieren die aktivierungsinduzierte Expression der Rezeptoren BTLA und CD160 .....	72
3.4.7	Die Expression von HVEM auf der T-Zelle ist nicht essentiell für die T-Zellinhibition über BTLA.....	73
3.4.8	Das BTLA-HVEM System ist auch an der Suppression der T-Zellaktivierung <i>in vivo</i> beteiligt.....	75
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>Expressionsanalysen als Voraussetzung für die Untersuchung der Funktion .....</b>	<b>78</b>
<b>4.2</b>	<b>BTLA reguliert die T-Zellaktivierung .....</b>	<b>79</b>

4.2.1	Die BTLA-Expression bestimmt die Stärke der T-Zellsuppression.....	80
4.2.2	Potentielle Rolle anderer HVEM-Bindungspartner für die T-Zellsuppression .....	81
4.2.3	Funktionelle Relevanz des negativen BTLA-Signals in der Immunantwort .....	83
<b>4.3</b>	<b>Gegenseitige Regulation von BTLA und HVEM .....</b>	<b>84</b>
<b>4.4</b>	<b>Bedeutung von BTLA für Homöostase und Überleben.....</b>	<b>85</b>
<b>4.5</b>	<b>BTLA-Funktion im komplexen Immungeschehen .....</b>	<b>87</b>
<b>4.6</b>	<b>Weitere Signale zusätzlich zum negativen BTLA-Signal .....</b>	<b>88</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>		<b>93</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>		<b>103</b>
<b>Danksagung.....</b>		<b>105</b>
<b>Publikationen .....</b>		<b>107</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>		<b>109</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Modell der T-Zellkostimulation .....	3
Abb. 2: Übersicht der Bindungspartner von HVEM, BTLA, LIGHT und CD160 .....	9
Abb. 3: Durchflusszytometrische Analyse .....	20
Abb. 4: Expression von BTLA mRNA in den transfizierten Zelllinien .....	32
Abb. 5: Spezifische Bindung von HVEM-Fusionsprotein an mit BTLA transfizierte Zelllinien .....	33
Abb. 6: Initiale Charakterisierung eines generierten BTLA-spezifischen mAK.....	34
Abb. 7: Analyse der anti-BTLA AK auf Blockade der HVEM-Fusionsproteinbindung.....	35
Abb. 8: Spezifität und Affinität der generierten anti-BTLA mAK.....	37
Abb. 9: Vergleich der Bindungsstellen der verschiedenen anti-BTLA mAK untereinander.....	38
Abb. 10: Anti-BTLA mAK Bindungsstellen im Vergleich mit dem Liganden .....	39
Abb. 11: Detektion der BTLA-Expression in verschiedenen Geweben der Maus.....	42
Abb. 12: Analyse der BTLA-Expression auf verschiedenen Zellpopulationen der Milz.....	44
Abb. 13: Expression von BTLA in Abhängigkeit von der Lymphozytendifferenzierung.....	46
Abb. 14: Expression von BTLA nach Lymphozytenaktivierung .....	47
Abb. 15: Kinetik der BTLA-Expression auf <i>in vitro</i> aktivierten T-Zellen .....	49
Abb. 16: Kinetik der BTLA-Expression nach antigenspezifischer Aktivierung von T-Zellen <i>in vivo</i> ...	50
Abb. 17: BTLA und HVEM-Expression auf CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach T-Zellaktivierung.....	52
Abb. 18: T- und B-Zellpopulationen in BTLA-defizienten Mäusen .....	54
Abb. 19: T- und B-Zellpopulationen in Mäusen mit T-Zellspezifischer Überexpression von BTLA ....	55
Abb. 20: Analyse von T-Gedächtniszellen in Mäusen mit T-Zellspezifischer Überexpression von BTLA .....	56
Abb. 21: Analyse der initialen Aktivierung von T-Zellen der genetisch veränderten Mäuse.....	58
Abb. 22: Expression von BTLA und HVEM auf T-Zellen der genetisch veränderten Mäuse .....	59
Abb. 23: Inhibition der T-Zellaktivierung durch HVEM .....	61
Abb. 24: Differenzielle Inhibition der T-Zellaktivierung durch HVEM auf CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.	62
Abb. 25: Einfluss verschiedener Signale auf die von HVEM vermittelte Wirkung.....	63
Abb. 26: Abhängigkeit der von HVEM vermittelten Suppression von BTLA – BTLA-defiziente T-Zellen .....	65
Abb. 27: Abhängigkeit der von HVEM vermittelten Suppression von der BTLA-Expression – Überexpression von BTLA auf den T-Zellen .....	67
Abb. 28: Suppression der Aktivierung von LIGHT-defizienten T-Zellen durch HVEM .....	69
Abb. 29: Differenzielle Expression von CD160 auf CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	70
Abb. 30: Expression von CD160 nach Aktivierung von BTLA-defizienten T-Zellen. ....	71
Abb. 31: Expression von BTLA und CD160 nach Suppression der T-Zellaktivierung durch HVEM..	72
Abb. 32: Relevanz der HVEM-Expression auf T-Zellen für die Suppression der T-Zellaktivierung....	74
Abb. 33: Initiale Analyse der BTLA-HVEM Funktion <i>in vivo</i> .....	76

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten mAK.....	13
Tab. 2: Übersicht über die zur Klonierung verwendeten Primer .....	14
Tab. 3: Übersicht der für die TaqMan-PCR verwendeten Oligonukleotide.....	16
Tab. 4: Übersicht der genutzten Fluorochrome .....	18
Tab. 5: Transfektionsbedingungen zur Generierung stabiler BTLA-Transfektanten .....	23
Tab. 6: Übersicht der durchgeführten Immunisierungen zur Generierung von BTLA-spezifischen mAK .....	26
Tab. 7: Übersicht der durchgeführten Transfektionen von Zelllinien mit BTLA .....	31
Tab. 8: Vergleich der Aminosäuresequenzen von BTLA aus Maus, Ratte und Mensch.....	34
Tab. 9: Übersicht der in dieser Arbeit generierten anti-BTLA mAK.....	36

# 1 Einleitung

Protektive Immunität erfordert die Interaktion von angeborener und adaptiver Immunantwort. Um die Manifestation schwerer Infektionen zu verhindern, muss eine unmittelbare Reaktion gegen Pathogene durch die angeborene Immunabwehr genauso gewährleistet sein, wie eine Weitergabe spezifischer Informationen an antigenverarbeitende Zellen des adaptiven Systems. Die Informationsübermittlung erfolgt dabei durch Interaktion verschiedener spezialisierter Zelltypen. In diesem Zusammenhang spielen besonders Zelloberflächenmoleküle eine entscheidende Rolle. Sie sind beteiligt an der Antigenerkennung oder fungieren als Rezeptoren für lösliche Stoffe, wie Zytokine oder Chemokine. Weiterhin beeinflussen sie als Zelladhäsionsmoleküle die Interaktion zwischen Zellen, indem sie zur Stabilisierung der Zellkontakte beitragen. Eine wichtige Funktion von Zelloberflächenmolekülen ist es auch, Signale in das Zellinnere weiterzugeben und so zelluläre Vorgänge, wie Proliferation und Differenzierung zu steuern. Diese Signaltransduktion kann nach Bindung entsprechender Partnermoleküle auf der Oberfläche anderer Zellen infolge eines direkten Zell-Zell-Kontaktes ausgelöst werden. Um eine effektive Immunantwort nur im inflammatorischen, bzw. infektiösen Kontext sicherzustellen, und so eine Bekämpfung von harmlosen Antigenen und Selbstantigenen zu verhindern, ist eine strikte Kontrolle der Aktivierung aller beteiligten Zellpopulationen notwendig. Es müssen sowohl Mechanismen existieren, die eine Aktivierung auslösen und auch verstärken können, auf der anderen Seite aber auch Kontrollmechanismen, die eine bereits ausgelöste Immunantwort terminieren können bzw. dazu dienen, eine unangebrachte Aktivierung zu verhindern. Ein Grundprinzip des Immunsystems ist dabei die permanente Integration von aktivierenden und dämpfenden Signalen zur Herstellung einer optimalen Balance sowohl für die Homöostase als auch für die Immunantwort. Eine Störung dieser Balance steht in engem Zusammenhang mit der Entstehung von Allergien und Autoimmunität.

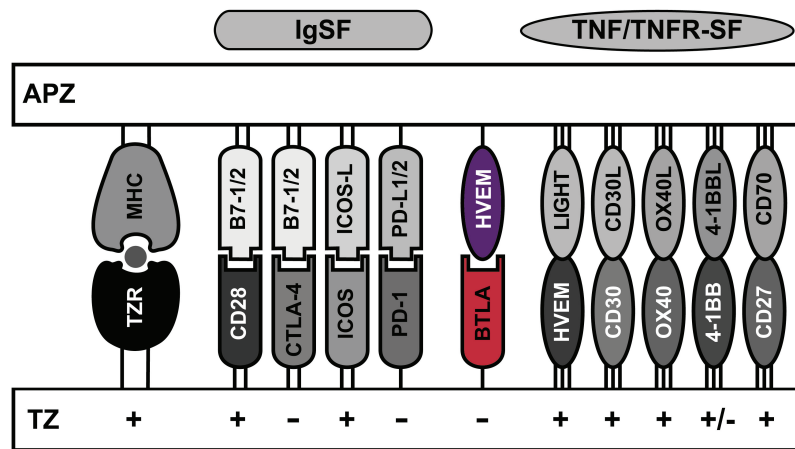
Fremde (Erreger-) Antigene werden im Immunsystem von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) aufgenommen, prozessiert und genau wie Autoantigene den T-Zellen (TZ) präsentiert. Im Falle eines eingedrungenen Erregers werden naive T-Zellen, die im Ruhezustand im Körper zirkulieren, aktiviert. Unter Mitwirkung verschiedener Chemokinrezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle wie L-Selektin (CD62L) gelangen naive T-Zellen in die sekundär-lymphatische Gewebe, wo sie nach erfolgter Aktivierung expandieren und je nach Art des Stimulus zu verschiedenartigen Effektor-T-Zellen, wie T-Helferzellen ( $T_H1$  und  $T_H2$ ) oder

regulatorischen T-Zellen ( $T_{\text{reg}}$ ) differenzieren können (Reinhardt *et al.*, 2006). Die Lebensdauer der Effektorzellen ist durch programmierten Zelltod begrenzt. Durch das Überleben einiger antigenerfahrener Zellen wird die Bildung eines Gedächtnisses für ein gegebenes Antigen gewährleistet. Einige T-Gedächtniszellen (*Central Memory*,  $T_{\text{CM}}$ ) verbleiben in den sekundärlymphatischen Organen, sie exprimieren weiterhin CD62L, andere (*Effector Memory*,  $T_{\text{EM}}$ ) exprimieren nur geringe Mengen CD62L und können die lymphatischen Gewebe verlassen. Bei erneutem Antigenkontakt kann so eine schnelle und effektive, aber dennoch spezifische Immunantwort erfolgen, indem reaktivere, bereits antigenerfahrene Zellen auch in der Peripherie Effektorfunktionen ausüben oder durch schnelle Teilung den Wiederaufbau eines effizienten Reservoirs an Effektorzellen sicherstellen (Sallusto *et al.*, 2004). T-Zellen haben somit eine zentrale Stellung innerhalb der adaptiven Immunantwort. Sie steuern nach Aufnahme der Informationen von den APZ als Effektorzellen die weiteren Reaktionen der antigenspezifischen Immunantwort.

Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt über den antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR), nach Erkennung von Peptiden, die auf MHC-Proteinkomplexen der APZ präsentiert werden. Verschiedene Zelloberflächen-Rezeptoren tragen zur Modulation des TZR-Signals bei, in einem Prozess der als Kostimulation bezeichnet wird. Dabei werden von positiven Kostimulatoren weitere aktivierende Signale vermittelt, von negativen Kostimulatoren hingegen inhibierende Signale, die zwar Signale des TZR-Komplexes beeinflussen, von selbst T-Zellen aber nicht funktionell aktivieren können. Durch Integration der Signale aller kostimulatorischen und koinhibitorischen Rezeptoren auf einer Zelle wird der Zeitpunkt, die Stärke, Qualität und Dauer der TZ-Aktivierung bestimmt, der TZR definiert die Spezifität der T-Zellantwort (Krocze *et al.*, 2004).

In den letzten Jahren wurden verschiedene Moleküle, sogar ganze Proteinfamilien identifiziert, die an der T-Zellkostimulation beteiligt sind. Die am besten untersuchten Familien in diesem Zusammenhang sind die TNF/TNFR-Familie und die B7/CD28-Immunglobulinfamilie. Obwohl beide Proteinfamilien strukturell sehr verschieden sind, wurde mit dem kürzlich identifizierten BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*, CD272) ein Bindeglied zwischen beiden Familien gefunden. BTLA ist zwar strukturell mit CD28 verwandt, interagiert aber mit HVEM (*herpes virus entry mediator*), einem Mitglied der TNFR-Familie. Durch diese zwei Proteinfamilien stehen jeweils verschiedene kostimulatorische und auch inhibitorische Zelloberflächenmoleküle zur Verfügung, die die T-Zellantwort regulieren (Abb. 1) und damit einerseits die effektive Bekämpfung von

Pathogenen durch Aktivierung der Zellen sicherstellen, aber auch für die Entwicklung von Toleranz gegenüber nicht-pathogenen Antigenen durch Dämpfung der Signale wichtig sind.



**Abb. 1: Modell der T-Zellkostimulation**

Durch Interaktion von T-Zellen (TZ) mit antigenpräsentierenden Zellen (APZ) modulieren verschiedene Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) und der TNF/TNFR-Superfamilie (TNF/TNFR-SF) die T-Zellaktivierung durch positive (+) und negative (-) Signale. Die Interaktion von BTLA mit HVEM stellt eine Verbindung zwischen den beiden Proteinfamilien dar.

## 1.1 TNF/TNFR-Superfamilie

Mitglieder der TNFR-Familie sind Klasse-I-Transmembranproteine, die extrazelluläre Cystein-reiche Domänen (CRDs) besitzen. Über diese Domänen erfolgt die Bindung der TNF-Liganden, die für eine weitere intrazelluläre Signalübermittlung notwendig ist. Die TNF-Liganden sind meist Transmembranproteine vom Typ-II, mit konservierten C-terminalen TNF-Homologiedomänen, über die wiederum die Rezeptorbindung erfolgt (Bodmer *et al.*, 2002). Eine Beteiligung von Molekülen der TNF/TNFR-Familie an der Morphogenese der sekundärlymphatischen Organe (Locksley *et al.*, 2001; Fu und Chaplin, 1999) ist genauso beschrieben, wie eine Beeinflussung von Homöostase, Aktivierung und Überleben verschiedener lymphatischer Zellen (Banks *et al.*, 1995; Futterer *et al.*, 1998; Gommerman und Browning, 2003). Eine wichtige Rolle für die T-Zellkostimulation spielen die Mitglieder der TNFR-Familie OX40, 4-1BB, CD30, CD27, GITR und das Zelloberflächenprotein HVEM (Watts, 2005).

HVEM (*herpes virus entry mediator*, TNFRSF14, Tr2; ATAR, Hve-A), wurde ursprünglich als zellulärer Rezeptor für Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) beschrieben (Montgomery *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu den Apoptose-induzierenden Rezeptoren der TNFR-Familie, wie z.B. Fas (CD95) und TNFR1, die Caspasen aktivieren und so zum

programmierten Zelltod führen können, enthält HVEM als konserviertes Strukturelement keine sogenannte Todesdomäne (Locksley *et al.*, 2001; Aggarwal, 2003). HVEM besitzt wie andere kostimulatorische Moleküle der TNFR-Familie (CD40, 4-1BB und OX40) intrazellulär konservierte Bindungsstellen für TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren (TRAFs). Durch Bindung dieser Moleküle an HVEM nach Interaktion mit Liganden der TNF-Familie können verschiedene intrazellulärer Signalwege aktiviert werden, die in der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B münden. Weiterhin wurden die Aktivierung der Jun N-terminalen Kinase (JNK) und des Aktivator-Proteins 1 (AP1) beschrieben (Hsu *et al.*, 1997; Marsters *et al.*, 1997; Dempsey *et al.*, 2003). Die damit assoziierten Signalwege sind beteiligt an Prozessen der Zellaktivierung, Zelldifferenzierung und Überleben der Zellen.

## 1.2 B7/CD28-Superfamilie

Einige Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) werden aufgrund ihrer Homologie zu CD28, dem am besten untersuchten T-Zellkostimulator, zu einer eigenständigen Proteinfamilie zusammengefasst. Die Rezeptoren der CD28-IgSF sind glykosylierte Transmembranproteine des Typ-I, die extrazellulär eine variable Immunglobulindomäne (IgV) besitzen. Moleküle der B7-Familie sind Typ-I Transmembranproteine, mit jeweils einer variablen (IgV) und konstanten (IgC) extrazellulären Immunglobulindomäne (Carreno und Collins, 2002), die als Liganden für die Moleküle der CD28-Familie fungieren. Dabei werden durch die Rezeptoren CD28 und ICOS (*Inducible Costimulator*) die Signale des TZR verstärkt (Aruffo and Seed, 1987; Hutloff *et al.*, 1999), hingegen inhibieren sowohl CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte Antigen*) als auch PD-1 (*Programmed Death 1*) die TZR-vermittelte Phosphorylierung von ZAP70/CD3 $\zeta$  (Sheppard *et al.*, 2004). Außerdem wird durch Signale dieser beider Rezeptoren die von CD28 vermittelte Aktivierung des Akt-Signalweges inhibiert, somit Signale, die für die Proliferation und das Überleben der Zellen notwendig sind (Alegre *et al.*, 2001; Frauwirth und Thompson, 2004).

Das murine *btla* Gen wurde ursprünglich als T<sub>H</sub>-1 spezifisches Transkript isoliert (Watanabe *et al.*, 2003). Unabhängig davon wurde es als stark induziertes Gen während der positiven Selektion von Thymozyten identifiziert (Han *et al.*, 2004). BTLA besitzt in der zytoplasmatischen Domäne, wie die negativ kostimulatorischen Moleküle CTLA-4 und PD-1, konservierte inhibitorische Motive, über die Phosphatasen rekrutiert werden können, die an der negativen Modulation von Antigen-Rezeptor-Signalwegen beteiligt sind (Gavrieli *et al.*, 2003; Gavrieli und Murphy, 2006). Obwohl die genaue Signaltransduktion über BTLA bisher

nicht bekannt ist, konnte eine Interaktion von BTLA mit CD3 $\zeta$  gezeigt werden. Wie auch durch CTLA-4 und PD-1 ist über BTLA eine Inhibition der Tyrosin-Phosphorylierung des TZR $\zeta$ -Komplexes während der T-Zellaktivierung möglich (Wu *et al.*, 2007). Allerdings enthält BTLA weiterhin eine Bindungsstelle für Grb-2 (*growth factor receptor bound 2*) (Watanabe *et al.*, 2003; Gavrieli *et al.*, 2003). Ein ähnliches Motiv ist bei CD28 für die Rekrutierung von Grb-2 und der PI3K verantwortlich, wodurch der PI3K-AKT Signalweg aktiviert und so die IL-2 Produktion und weitere Überlebenssignale induziert werden (Alegre *et al.*, 2001). Zwar konnte eine Bindung von Grb-2 an BTLA unter *in vivo* Bedingungen bisher nicht aufgezeigt werden, potentiell könnten aber durchaus Überlebenssignale über BTLA vermittelt werden, ähnlich wie durch CD28 und ICOS (Gavrieli und Murphy, 2006).

Aufgrund der Zuordnung von BTLA zur CD28-Familie blieb die initiale Suche nach Liganden von BTLA nur auf B7-homologe Moleküle begrenzt. Die ursprünglich angenommene Interaktion mit B7x (Watanabe *et al.*, 2003), wurde in weiterführenden Studien jedoch nicht bestätigt (Sedy *et al.*, 2005). Umfassendere Ansätze zeigten schließlich, dass BTLA mit dem TNFR HVEM interagiert. Unabhängig voneinander wurde diese direkte Protein-Protein-Interaktion mittels unterschiedlicher Methoden sowohl für die murinen als auch die humanen Proteine gezeigt (Sedy *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2005). Weiterhin ist nach Bindung von HVEM *in vitro* die Phosphorylierung aller drei intrazellulären Motive von BTLA beschrieben (Sedy *et al.*, 2005), wodurch eine Signalgebung über BTLA durch Interaktion mit HVEM verdeutlicht wird. Aufgrund eines Sequenzpolymorphismus im murinen *btla* Gen werden in unterschiedlichen Mausstämmen verschiedene BTLA-Proteine gebildet (Sedy *et al.*, 2005), wodurch die Bindung von HVEM jedoch nicht beeinflusst wird (Gonzalez *et al.*, 2005).

### **1.3 Kostimulatorische Rezeptoren regulieren verschiedene Phasen der T-Zellantwort**

Einige der kostimulatorischen Rezeptoren wie CD28, CD27 und HVEM sind bereits konstitutiv auf T-Zellen exprimiert (Gross *et al.*, 1992; Gravestien *et al.*, 1993; Kwon *et al.*, 1997). Diese Moleküle können so bereits bei der initialen Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen durch Peptid-präsentierende Dendritische Zellen (DZ) ihre Funktion ausüben. Eine wichtige Rolle spielt dabei besonders CD28, welches als wichtigster Kostimulator für naive T-Zellen gilt (Sharpe und Freeman, 2002). Die meisten kostimulatorischen Rezeptoren werden jedoch erst nach TZ-Aktivierung durch Antigenerkennung über den TZR induziert,

wie z.B. für ICOS, OX40, 4-1BB, PD-1 und CTLA-4 beschrieben (Hutloff *et al.*, 1999; Mallett *et al.*, 1990; Pollok *et al.*, 1993; Agata *et al.*, 1996; Linsley *et al.*, 1992), was die funktionelle Beteiligung dieser Moleküle auch an späteren Prozessen der T-Zellantwort impliziert. Weiterhin können in einer Kaskade von Reaktionen frühe Signale von kostimulatorischen Rezeptoren durchaus weitere Kostimulatoren beeinflussen, so wirkt CD28 verstärkend auf die T-Zellexpression von ICOS (McAdam *et al.*, 2000) oder OX40 (Rogers *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 1999). Kostimulatorische Moleküle können abhängig vom Zeitpunkt ihrer Expression sowohl die initiale Aktivierung, aber auch die T-Zellen in der Effektorphase, weiterhin die Expansion und das Überleben der antigenspezifischen T-Zellen modulieren.

#### **1.4 Kostimulatorische Moleküle werden auf verschiedenen Zellen exprimiert**

Während die Expression von CD28, CTLA-4 und ICOS auf T-Zellen begrenzt ist, werden andere Kostimulatoren, wie PD-1, 4-1BB, CD27, HVEM und BTLA auch auf anderen Zelltypen exprimiert. Damit ist ebenso eine Modulation der Aktivierung weiterer Zellpopulationen über diese Moleküle möglich. Die Liganden der kostimulatorischen Moleküle sind meist weit verbreitet exprimiert, neben einer Expression auf professionellen antigen-präsentierenden Zellen sind einige der Liganden auf Zellen des Endothels, Epithels und anderen peripheren Geweben vorhanden, aber auch auf den T-Zellen selbst. Einzelne Liganden werden dabei nicht nur auf verschiedenen Zelltypen exprimiert, sondern auch zu verschiedenen Zeitpunkten der Immunantwort. Wie für die kostimulatorischen Rezeptoren beschrieben, werden auch einige Liganden konstitutiv exprimiert, die Expression der Liganden von OX-40, 4-1BB, CD28 und PD-1 wird auf aktivierten APZ induziert, bzw. deutlich heraufreguliert. Eine Modulation der T-Zellaktivierung kann so im Kontakt mit verschiedenen Zellen erfolgen, bei der initialen Aktivierung der T-Zelle durch DZ, weiterhin durch die Interaktion der T-Zellen mit B-Zellen zum Auslösen einer humoralen Immunantwort, aber auch während der Migration der T-Effektorzellen in andere Gewebe. Die Kontrolle der Expression beider Partnermoleküle sichert eine angemessene Immunantwort und bietet eine Reihe von weiteren Regulationsmöglichkeiten, je nach Lokalisation und Aktivierungsgrad der beteiligten Zellen. Beispielsweise ist zwar der ICOS-Ligand (ICOS-L) konstitutiv auf B-Zellen vorhanden (Ling *et al.*, 2000), da ICOS auf den T-Zellen aber erst nach Aktivierung induziert wird (Hutloff *et al.*, 1999), werden so kontinuierliche positive Signale für die T-Zelle über ICOS im Kontakt mit B-Zellen verhindert. Die verschiedenen



kostimulatorische Signalwege greifen auch auf den interagierenden Zellen ineinander. Werden T-Zellen im Kontakt mit APZ aktiviert, so werden von CD28 Signale für die Induktion verschiedener kostimulatorischer Rezeptoren vermittelt, aber auch für die Induktion von Liganden für Rezeptoren auf APZ, wie CD40L. Über Interaktion mit CD40 auf der professionellen APZ, werden auf dieser wiederum die Liganden für T-Zellkostimulatoren induziert. Durch diese Rückkopplung kann die TZ-Aktivierung weiter verstärkt, oder bei überwiegender negativen Kostimulation terminiert werden. In enger Wechselwirkung mit den interagierenden Zellen regulieren so kostimulatorische Moleküle die gegenseitige weitere Differenzierung aller beteiligten Zellen (Sharpe und Freeman, 2002; Croft, 2003).

### **1.5 Präferenz für kostimulatorische Signalwege in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Für die Immunantwort gegen intrazelluläre Erreger spielen CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine wichtige Rolle. Nach Prozessierung intrazellulärer Proteine werden die Peptide auf MHC-I Molekülen präsentiert. Diese werden von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen TZ erkannt, die daraufhin die infizierten Zellen eliminieren. Im Gegensatz dazu aktivieren CD4<sup>+</sup> T-Zellen weitere Zellen, wie B-Zellen, die daraufhin lösliche Immunglobuline (Antikörper) gerichtet gegen pathogen-spezifische Strukturen produzieren, oder auch Makrophagen. Durch diese Förderung zellulärer und auch humoraler Immunantworten haben CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine wichtige Funktion bei der Bekämpfung extrazellulärer Erreger. Viele Publikationen beschreiben für beide TZ-Subtypen eine unterschiedliche Relevanz bestimmter kostimulatorischer Signalwege (vor allem für OX40, 4-1BB und ICOS), die offenbar bevorzugt von jeweils einer Subpopulation zur Modulation der TZ-Aktivierung genutzt werden. In verschiedenen Infektionssystemen wirkt sich das Fehlen von 4-1BB-Signalen eher auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort aus (Tan *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2000; Bertram *et al.*, 2002a; Kwon *et al.*, 2002; Whitmire und Ahmed, 2000), dagegen zeigen sowohl OX40- als auch ICOS-defiziente Mäuse vorwiegend Defekte in der CD4<sup>+</sup> T-Zellfunktion (Chen *et al.*, 1999; Kopf *et al.*, 1999; Murata *et al.*, 2000; Bertram *et al.*, 2002b). ICOS-Defizienz führt auch beim Menschen zu deutlichen Defiziten bei der durch CD4<sup>+</sup> T-Zellhilfe vermittelten B-Zellantwort (Grimbacher *et al.*, 2003). Zwar werden diese Kostimulatoren auf beiden TZ-Subpopulationen exprimiert, dennoch gibt es deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke. Unter den meisten Bedingungen ist die ICOS-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich stärker als auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Beier *et al.*, 2000; Yoshinaga *et al.*, 1999; Löhning *et al.*, 2003), was auch für die OX40-Expression beschrieben wurde (Taraban *et al.*, 2002; Weinberg *et al.*, 1998), wohingegen 4-1BB stärker auf CD8<sup>+</sup>

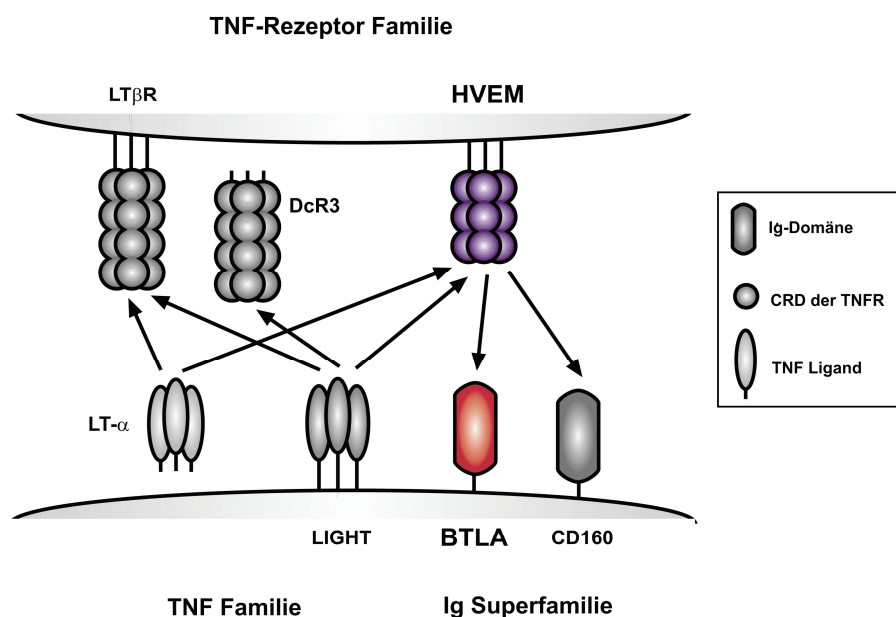
T-Zellen exprimiert wird (Bukczynski *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2002). Aufgrund dieser differenziellen Expression der Moleküle liegt eine oft präferenzielle Funktion für nur eine TZ-Subpopulation nahe. Dass dies nicht als absolute Beschränkung auf eine der Zellpopulationen anzusehen ist, zeigen adoptive Transfermodelle mit antigenspezifischen T-Zellen, in denen CD4<sup>+</sup> und auch CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten sowohl durch kostimulatorische Signalwege von OX40 als auch 4-1BB beeinflusst werden (Dawicki und Watts, 2004; Bansal-Pakala *et al.*, 2004). Mittlerweile ist die Wirkung dieser kostimulatorischen Rezeptoren auf beide TZ-Subpopulationen für verschiedene Situationen beschrieben (Cannons *et al.*, 2001). Dadurch wird deutlich, dass die Funktionalität kostimulatorischer Signalwege abhängig von Signalen der Umgebung im Kontext der untersuchten Immunreaktionen sein kann, und in enger Verbindung mit der Expression des kostimulatorischen Moleküls steht.

## 1.6 Komplexe Netzwerke kostimulatorischer Signalwege

Für die Mehrzahl der kostimulatorischen Rezeptoren ist die Interaktion mit nur einem spezifischen Liganden beschrieben, dazu zählen z.B. ICOS, 4-1BB, OX40 und CD27 (Mages *et al.*, 2000; Goodwin *et al.*, 1993; Godfrey *et al.*, 1994; Bowman *et al.*, 1994). Der negative Kostimulator PD-1 besitzt zwei Liganden aus der B7-Familie, PD-L1 und PD-L2, die unterschiedlich exprimiert werden (Freeman *et al.*, 2000; Latchman *et al.*, 2001). Auch CD28 und CTLA-4 können mit zwei Liganden interagieren, beide binden sowohl CD80 als auch CD86 (Azuma *et al.*, 1993; Linsley *et al.*, 1991; Linsley *et al.*, 1994).

In den Signalweg von HVEM und BTLA hingegen greifen eine Vielzahl an weiteren Interaktionspartnern ein (Abb. 2). So sind für HVEM auch Interaktionen mit den TNF-verwandten Molekülen LIGHT (*lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, und competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes*; TNFSF14) und Lymphotoxin- $\alpha$  (LT $\alpha$ ) beschrieben (Mauri *et al.*, 1998). Während LT $\alpha$  (in Form eines löslichen Homotrimers) auch mit TNFR1, TNFR2 und dem Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptor (LT $\beta$ R) interagieren kann, ist LIGHT (membrangebundenes Homotrimer) ebenfalls in der Lage an LT $\beta$ R und zusätzlich den löslichen TNFR DcR3 (*Death Decoy* Rezeptor 3; TR6) zu binden (Smith *et al.*, 1990; Mauri *et al.*, 1998; Zhai *et al.*, 1998; Rooney *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1999). DcR3 fehlen entsprechende intrazelluläre Motive für die Signaltransduktion. Über Konkurrenz mit anderen Rezeptoren der TNFR-Familie um die Liganden beeinflusst DcR3 jedoch indirekt die Aktivierung derer Signaltransduktionskaskaden (Dempsey *et al.*, 2003).

Durch Blockadestudien und Bindungsanalysen verschiedener HVEM-Mutanten wurden als Bindungsregionen für sowohl LIGHT als auch LT $\alpha$  die CRD2 und 3 von HVEM identifiziert (Sarrias *et al.*, 2000), vergleichbar mit der Bindung von LT $\alpha$  an TNFR1 (Banner *et al.*, 1993; Fu *et al.*, 1995). Ähnliche Untersuchungen haben gezeigt, dass BTLA hingegen an die CRD1 von HVEM bindet, was auch durch die Kristallstruktur eines Komplexes aus rekombinantem humanen BTLA und HVEM bestätigt wurde (Sedy *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2008). Bisher liegen jedoch keine Strukturanalysen bezüglich HVEM mit dessen TNF-Liganden vor. Zu dieser ohnehin komplexen Situation wurde kürzlich CD160 als ein weiterer Bindungspartner für HVEM identifiziert (Cai *et al.*, 2008).



**Abb. 2: Übersicht der Bindungspartner von HVEM, BTLA, LIGHT und CD160**

Schematische Darstellung der Interaktionsmöglichkeiten zwischen Mitgliedern der TNFR-Familie: LT $\beta$ R, DcR3 und HVEM, der TNF-Familie: LIGHT und LT $\alpha$  und der IgSF: BTLA und CD160. HVEM bindet sowohl an BTLA als auch CD160. Die Liganden für HVEM sind LIGHT und LT $\alpha$ . LIGHT bindet zusätzlich auch an DcR3 und LT $\beta$ R. Die Richtung der Pfeile gibt die Richtung der Signalübertragung an. CRD = Cystein-reiche Domäne.

CD160, wie BTLA ein Mitglied der IgSF, wurde ursprünglich auf NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen, sowie intraepithelialen Lymphozyten (IEL) des Darms als Bindungspartner für MHC-I beschrieben (Anumanthan *et al.*, 1998; Agrawal *et al.*, 1999). *In vitro* konnte über Stimulation mit CD160-spezifischen Antikörpern in NK-Zellen eine Phosphorylierung von Akt unter Beteiligung der PI3K ausgelöst werden (Rabot *et al.*, 2007). Welche Signale in T-Zellen durch HVEM Bindung über CD160 ausgelöst werden, ist nicht bekannt. Eine zusätzliche Komplexität ist dadurch gegeben, dass alle Interaktionspartner auf diversen Zellen des Immunsystems exprimiert werden können, im Ruhezustand und nach Zellaktivierung.

Auch eine Koexpression der beteiligten Moleküle ist anzunehmen (Kwon *et al.*, 1997; Mauri *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2004). So besteht allein im BTLA/HVEM/CD160/LIGHT-System die Möglichkeit von multiplen Rezeptor-Ligand-Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen (in *trans*) und sogar auf der gleichen Zelle (in *cis*).

Im Einklang mit der Existenz intrazellulärer inhibitorischer Motive wurde BTLA in der Literatur als ein negativer Regulator der T-Zellaktivierung beschrieben. BTLA-defiziente Mäuse zeigen sowohl eine minimal erhöhte Anfälligkeit für die Peptid-induzierte experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE), als auch eine länger anhaltende allergische Atemwegsinfektion (Watanabe *et al.*, 2003; Deppong *et al.*, 2006). Ähnliche Ergebnisse mit HVEM-defizienten Mäusen (Wang *et al.*, 2005) verdeutlichen die negative Funktion des BTLA-HVEM-Signalweges. Es wurde weiterhin eine leicht erhöhte Proliferation von BTLA-defizienten Lymphozyten nach Aktivierung über den TZR beschrieben. Allerdings sind die durch BTLA-Defizienz hervorgerufenen Effekte eher diskret. Während sich gezeigt hat, dass die Interaktion von HVEM mit BTLA die T-Zellantwort in einem gewissen Grad negativ regulieren kann, wird die HVEM-LIGHT-Interaktion als positives kostimulatorisches Signal für die HVEM-exprimierende T-Zelle angesehen. So wird durch lösliches LIGHT die T-Zellproliferation verstärkt, und die Überexpression von LIGHT in transgenen Tieren führt zu erhöhter klonaler T-Zell-Expansion, Inflammation und Autoimmunität (Shaikh *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Ein direkter Einfluss der LIGHT-Defizienz auf die Aktivierung von T-Zellen wird jedoch kontrovers diskutiert (Liu *et al.*, 2003; Scheu *et al.*, 2002; Tamada *et al.*, 2002). Probleme ergeben sich bei der Interpretation dieser Ergebnisse, da nicht in jedem Fall zwischen Effekten durch LIGHT-HVEM- oder LIGHT-LT $\beta$ R-Signalen unterschieden werden kann. Zumindest für den Phänotyp der LIGHT-transgenen Mäuse wurde eine Abhängigkeit von LT $\beta$ R gezeigt (Wang und Fu, 2003; Wang *et al.*, 2004). Daneben wird die Möglichkeit der Signaltransduktion über LIGHT in die Zelle diskutiert (Shi *et al.*, 2002; Wan *et al.*, 2002), wie auch für die anderen TNF-Liganden 4-1BBL, CD30L, CD40L, FasL und Ox40L (Langstein *et al.*, 1998; Wiley *et al.*, 1996; van Essen *et al.*, 1995; Suzuki und Fink, 1998; Stuber *et al.*, 1995). Über das BTLA/HVEM-System können so je nach weiterer Beteiligung anderer Moleküle sowohl positive als auch negative Signale vermittelt werden.

Aufgrund der Vielzahl modulierender Moleküle und der daraus resultierenden Komplexität potentieller molekularer Interaktionen, sind gerade die individuellen Beiträge einzelner kostimulatorischer Moleküle für die verschiedenen Prozesse der Immunantwort bisher nicht vollständig verstanden.

## **1.7 Aufgabenstellung**

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung des kostimulatorischen Moleküls BTLA, bezüglich seiner Expression und Funktion. Folgende Aufgaben wurden definiert:

- 1) Grundlage für die Detektion sind BTLA-spezifische Reagenzien. Daher sollten monoklonale Antikörper gegen murines BTLA generiert werden, weiterhin auch HVEM als Ligand von BTLA in einer Form exprimiert werden, die neben der Detektion von BTLA eine funktionelle Untersuchungen der Signale ermöglicht, die über die Bindung des physiologischen Liganden vermittelt werden. In diesem Zusammenhang sollten Reagenzien bereitgestellt werden, die auch die Möglichkeit zur Blockade dieser Interaktion bieten.
- 2) Durch die genaue Charakterisierung der BTLA-Expression im Maussystem, im Gewebe, aber auch auf Einzelzellebene, sollten Wirkungsbereiche des Moleküls definiert werden, auch unter gleichzeitiger Einbeziehung der Lokalisation des Interaktionspartners HVEM.
- 3) Um die Funktion von BTLA als Regulator von Immunantworten genauer zu verstehen, sollte die Bedeutung von BTLA sowohl im Ruhezustand des Organismus, als auch während der Lymphozyten-Aktivierung analysiert werden. Dabei sollte insbesondere der direkte Beitrag von BTLA zur Dämpfung der T-Zellantwort im Vergleich zu weiteren potentiell involvierten Molekülen untersucht werden.

## 2 Material/Methoden

### 2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Verwendete Chemikalien waren von der Qualität p.A. und wurden von den folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck Chemicals (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Steriles Plastikeinwegmaterial wurde von den Firmen Greiner GmbH (Frickenhausen), Nunc (Roskilde, Dänemark) oder Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

### 2.2 Tiere

Alle Tiere stammten aus einer SPF-Zucht (*specific pathogen free*) und wurden kurzzeitig in einem konventionellen Tierstall des Robert Koch-Institutes gehalten. Lewis-, Wistar, und CD-Ratten wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen, alle Mäuse wurden im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR, Berlin) gezüchtet und gehalten. Die Experimente wurden nach den staatlichen Richtlinien für Tierversuche durchgeführt und waren durch die lokale Ethikkommission genehmigt. Wenn nicht anders angegeben, wurden 8–12 Wochen alte Mäuse verwendet. Die BTLA-defizienten (BTLA<sup>-/-</sup>) und BTLA-überexprimierenden BTLA tg #130 Mäuse (BTLAtg) wurden von Dr. D. Graf (*Biomedical Sciences Research Center A. Fleming*, Griechenland, unveröffentlicht) generiert. Die Defizienz für BTLA wurde dabei durch den Austausch von Exon 1 des *btla* Gens und einem Teil des proximalen Promotors mit einer Flox-Neomycin-Selektionskassette erreicht. Zur Überexpression von BTLA auf T-Zellen in den BTLAtg Mäusen wurde das *btla* Gen in das humane CD2-Minigen kloniert und in Pronuclei von superovulierten CBB10F1 Mäusen injiziert (Greaves *et al.*, 1989; Zhumabekov *et al.*, 1995). Positive Mäuse wurden mit PCR identifiziert. HVEM-defiziente Mäuse (Wang *et al.*, 2005) und LIGHT-defiziente Mäuse (Scheu *et al.*, 2002) wurden von Prof. Dr. K. Pfeffer (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland) bereit gestellt. Die genetisch veränderten Mäuse wurden für 10 Generationen auf C57BL/6 zurückgekreuzt. In allen Experimenten mit diesen Mäusen wurden C57BL/6 Mäuse (wt) des gleichen Alters als Kontrolltiere verwendet.

Für adoptive Transferexperimente wurden B6.PL.OT-II Mäuse verwendet, die einen transgenen T-Zell-Rezeptor (TZR-transgen) für Ovalbuminpeptid (OVA<sub>323–339</sub>) exprimieren (Barnden *et al.*, 1998). Die zusätzliche Kreuzung mit B6.PL-Mäusen (Jackson) erlaubt die Nachverfolgung der adoptiv transferierten Zellen über die Expression von CD90.1 (Thy1.1).

## 2.3 Monoklonale Antikörper

**Tab. 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten mAK**

Die Antikörper wurden für Durchflusszytometrie, magnetische Zellsortierung und Immunhistochemie eingesetzt. Die Angabe „Hybridom“ steht für laboreigene Hybridome, aus deren Kulturüberstand die Antikörper gereinigt wurden. ATCC: American Type Culture Collection, ECACC: European Collection of Cell Cultures

Antigenspezifität	Klonbezeichnung	Quelle	Referenz/Hersteller
CD3	KT3	Hybridom	(Tomonari, 1988)
CD4	GK1.5	Hybridom	ATCC: TIB 207
CD4	YTS 191.1	Hybridom	ECACC:87072282
CD8	53-6.72	Hybridom	ATCC: TIB 105
CD11b	5C6	Hybridom	ATCC: CRL-1969
CD11c	N418	Hybridom	ATCC: HB-224
CD19	1D3	Hybridom	ATCC: HB-305
CD21	7G6	kommerziell	BD Biosciences
CD23	B3B4	kommerziell	eBioscience
CD25	2E4	Hybridom	(Ortega <i>et al.</i> , 1984)
CD44	IM7.8.1	Hybridom	ATCC: TIB 235
CD45R (B220)	RA3-6B2	Hybridom	(Coffman, 1982)
CD62L	MEL-14	Hybridom	ATCC: HB-132
CD69	H1.2F3	kommerziell	eBioscience
CD90 (Thy-1)	G7	Hybridom	(Logdberg <i>et al.</i> , 1985)
CD90.1 (Thy-1.1)	OX-7	Hybridom	ECACC: 84112008
CD93	AA4.1	kommerziell	eBioscience
CD134 (OX-40)	OX-86	Hybridom	ECACC: 96110601
CD137 (4-1BB)	17B5	kommerziell	eBioscience
CD278 (ICOS)	MIC280	Hybridom	(Löhning <i>et al.</i> , 2003)
CD279 (PD-1)	J43	kommerziell	eBioscience
IgD	11-26c	Hybridom	ATCC: HB-250
IgM	Bet-2	Hybridom	ATCC: HB-88
Ly-6G/C	RB6-8C5	Hybridom	(Hestdal <i>et al.</i> , 1991)
MHC-II	M5/114.15.2	Hybridom	ATCC: TIB 120
NK 1.1	PK136	kommerziell	BD PharMingen
V $\alpha$ 2-TZR	B20.1	kommerziell	eBioscience
V $\beta$ 5-TZR	MR9-4	kommerziell	BD Biosciences
HVEM	mHV-1411	Hybridom	S. Worbs, RKI
BTLA	mBT-1622	Hybridom	diese Arbeit
BTLA	mBT-33, -353, -1602, -1630 und -1953	Hybridom	diese Arbeit

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA aus Geweben wurden verschiedene Organe der Maus mit einem ULTRA-TURRAX (IKA Labortechnik) in Guanidinium-Hydrochlorid homogenisiert. Die RNA wurde über einen CsCl-Gradienten und anschließender Na-Acetat/Ethanol-fällung isoliert (Glisin *et al.*, 1974; Chirgwin *et al.*, 1979). Die RNA aus bis zu  $10 \times 10^6$  Zellen aus der Zellsuspension wurde unter Verwendung des *High Pure RNA Isolation Kit* von Roche nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Integrität der RNA wurde am Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) bestimmt. Die dafür verwendeten Reagenzien stammten aus dem RNA 6000 Nano oder Pico Kit (Agilent Technologies). Ausgewertet wurde mit der Software 2100 Expert (Agilent Technologies).

### 2.4.2 Klonierung von murinem BTLA und HVEM

Basierend auf Klonierungen aus der Literatur (Watanabe *et al.*, 2003) wurde die kodierende Sequenz (nt 1–684) für die extrazelluläre Domäne, die Transmembrandomäne und einen Teil der zytoplasmatischen Domäne von BTLA (AS 1–228) nach Standardmethoden kloniert. Für das HVEM-Fusionsprotein wurde die kodierende Sequenz der extrazellulären Domäne von HVEM (nt 1–621) kloniert. Dazu wurde nach reverser Transkription von C57BL/6 Milz-RNA bzw. Thymus-RNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die entsprechenden Sequenzen von BTLA bzw. HVEM aus der cDNA mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. In Tab. 2 sind die verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

**Tab. 2: Übersicht über die zur Klonierung verwendeten Primer**

Die Restriktionsschnittstelle in der Sequenz ist grau unterlegt. Die komplementäre Sequenz zur kodierenden Sequenz von HVEM und BTLA ist fett gedruckt, die Sequenz des Stop-Codons ist unterstrichen

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Restriktionsschnittstelle
BTLAup	CgATg <u>CTCgAgCACC</u> ATg AAg ACA gTg CCT gCC	<i>XhoI</i>
BTLAlp_I	ACTCTAgCggCCg <u>CTTAT</u> ggAATATCAACCaggTT Ag	<i>NotI</i>
BTLAlp	ACTCTATCTAg AAgAATATCAACCaggTTAgTg	<i>XbaI</i>
mHVEMfor	ATTATgAgCTCACCATggAACCTCTCCAggATgg	<i>SacI</i>
mHVEMrev	ATTATggA TCCgACCTgggAggAgCag	<i>BamHI</i>

Die reverse Transkription von 1 µg RNA (Kap. 2.4.1) erfolgte mit dem *AMV Reverse Transcription System* (Promega) unter Verwendung von Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primern.



Die PCR für murines BTLA wurde mit Pfu DNA-Polymerase (Stratagene) in einem Volumen von 50 µl durchgeführt, nach initialer Denaturierung für 4 min bei 94 °C folgten 40 Zyklen (94 °C 40 s; 61 °C 1 min; 75 °C 2 min) und 10 min 75 °C in einem Gene Amp PCR System 2400 Perkin Elmer (jetzt Applied Biosystems Inc.) Für die Klonierung von BTLA in BCMGS<sub>neo</sub> (Karasuyama *et al.*, 1989) wurden die Primer BTLAup und BTLAlp\_I verwendet. BTLAup und BTLAlp wurden für die Klonierung in pcDNA3-YFP (von B. Dorner, Robert Koch-Institut) eingesetzt. Durch diesen Vektor wurde BTLA als Fusionsprotein mit dem gelbfluoreszierenden Protein (YFP) exprimiert (Daubner *et al.*, 1987).

Die PCR für murines HVEM wurde mit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) und den Oligonukleotiden mHVEMfor und mHVEMrev durchgeführt, nach initialer Denaturierung für 30 s bei 98 °C folgten 40 Zyklen (98 °C 10 s; 61 °C 20 s; 72 °C 30 s) und 7 min 72 °C. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pRmHa3-MT-huIgG1 kloniert (Wallny, 1997). Der Vektor besitzt einen Metallothionein-Promotor und kodiert für die *Hinge*-Region sowie die C<sub>H</sub>2- und C<sub>H</sub>3-Domäne des humanen IgG1. Durch diesen Fc-Anteil von huIgG1 sollte das Fusionsprotein über die Ausbildung von Disulfidbrücken als Dimer in den SL3 Zellen exprimiert werden.

#### **2.4.3 Transformation in *E. coli* und Plasmidpräparation**

Zur Vermehrung der rekombinanten DNA wurden *E. coli* XL-1 blue durch Hitzschock nach Standardmethoden mit den Plasmiden transformiert (Hanahan *et al.*, 1991). Zur Selektion und für die Kultivierung der transformierten *E. coli* wurde LB/Amp-Medium (1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) und LB/Amp-Agar-Platten (LB/Amp + 1,5 % Agar) verwendet. Plasmidpräparationen erfolgten mit dem QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit und Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

#### **2.4.4 RNA Dot-Blot**

Zur Testung der generierten Transfektanten (Kap. 2.6.1) wurde die RNA aus jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen nach Cherwinski *et al.* (Cherwinski *et al.*, 1987) gewonnen. Die Lyse der Zellen erfolgte in 140 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 8,6, 0,5% NP-40. Die RNA-haltigen Überstände der Lysate wurden mit dem gleichen Volumen 0,9 M NaCl, 90 mM Na<sub>3</sub>-Citrat, 7,4 % Formaldehyd gemischt und für 15 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils gleiche Volumina (entsprechend der RNA aus der gleichen Anzahl Zellen) auf Nylonmembranen (ZetaBind, 0,45 µm; Cuno Inc., Meriden, CT) durch Vacuum-Blotting (Hybri.Dot Manifold, Whatman Biometra) transferiert. Die Hybridisierung mit radioaktiv

markierten Sonden ( $2 \times 10^6$  cpm) erfolgte in Rapid-Hyb-Puffer (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers. Nach dem Waschen (Kroczeck, 1993) wurden die Blots unter Verwendung geeigneter Verstärkerfolien auf Röntgenfilm (X-OMAT AR oder Biomax MS; Kodak, Rochester, NY) exponiert. Als Sonde wurden BTLA-DNA-Fragmente verwendet, die nach Verdau aus den generierten Plasmiden durch anschließende Gelextraktion (Qiagen) gereinigt wurden. Die Markierung der Sonde erfolgte mit  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Inc., Massachusetts, USA) unter Verwendung von DNA Labelling Beads (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers. Freie Nukleotide wurden über Sephadex G50 Gelfiltrationssäulen (GE Healthcare) abgetrennt. Die Quantifizierung der eingebauten  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -Nukleotide erfolgte in einem  $\beta$ -Szintillations-Meßgerät (LS 1801; Beckman, Palo Alto, CA).

#### 2.4.5 Real-Time-quantitative PCR

Zur Bestimmung der BTLA-Kopienzahl wurde die *Real-Time*-quantitative PCR mit TaqMan<sup>®</sup>-Sonden (TaqMan-PCR) durchgeführt. Die reverse Transkription von 1  $\mu\text{g}$  RNA (Kap. 2.4.1) erfolgte mit dem *AMV Reverse Transcription System* (Promega) unter Verwendung von Hexamer-Primern. Für die Analyse der BTLA-Kopienzahl innerhalb der cDNA wurden die Primer TMB-F und TMB-R zusammen mit der BTLA-Sonde verwendet. Als Referenz-Gen wurde  $\beta 2$ -Microglobulin amplifiziert (Tab. 3). Die TaqMan<sup>®</sup>-Sonden waren am 5'-Ende mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxy-Fluorescein) und am 3'-Ende mit dem Quencher TAMRA (6-Carboxy-tetramethylrhodamin) markiert.

Ansatz (20  $\mu\text{l}$ ): 1  $\times$  Absolute<sup>™</sup> QPCR ROX Mix (Thermo Fischer Scientific Inc);

300 nM von jedem Primer; 150 nM Sonde; 1/10 der cDNA

Die TaqMan-PCR wurde in Doppelbestimmungen am TaqMan 7700 Sequence Detection System (Stratagene) durchgeführt und analysiert, nach Enzymaktivierung für 15 min bei 95 °C folgten 50 Zyklen (95°C, 15 s; 60°C, 1 min). Anhand des mitgeführten Standards wurde eine Standardkurve berechnet und daraus die Kopienzahlen der Proben abgeleitet.

**Tab. 3: Übersicht der für die TaqMan-PCR verwendeten Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	PCR
TMB-F	CAAACTCTTCAGAACACCCACTAATAA	BTLA
TMB-R	TCTTCCCTTggATCCTTTTCA	
BTLA-Sonde	TCTgCTCCTTgCCTgTgTCTgCCTg	
bMG-F	ATTCACCCCCACTGAGACTGA	$\beta 2$ -Microglobulin
bMG-R	CTCGATCCCAGTAGACGGTC	
bMG-Sonde	TGCAGAGTTAAGCATGCCAGTATGGCCG	

## 2.5 Zellbiologische Methoden

### 2.5.1 Puffer

<b>PBS</b>	136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,05 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,3
<b>FACS-PBS</b>	PBS + 2,5 % FCS + 0,1 % NaN <sub>3</sub>
<b>MACS-PBS</b>	PBS + 0,5 % BSA (Fraktion V, Endotoxingehalt <1 EU/mg, PAA Laboratories GmbH, Cölbe)

### 2.5.2 Zellkulturmedien

Das Zellkulturmedium für murine Zellen basierte auf RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin) mit folgenden Zusätzen:

<b>R10F<sup>-</sup></b>	10 % fötales Kälberserum (FCS, Biochrom), 2 mM Glutamin (Invitrogen)
<b>R10F<sup>+</sup></b>	R10F <sup>-</sup> + 100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin (Invitrogen)

Weiterhin wurden zu den Medien entweder nur 50 µM β-Mercaptoethanol (β-ME) oder zusätzlich 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren und 1 mM Natrium-Pyruvat (Invitrogen, AS/Pyr) zugegeben.

Das Insektenzellmedium SFX<sup>+</sup> basierte auf HighClone SFX-Insect (Biochrom AG, Berlin), dem 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 2 mM Glutamin (Invitrogen) zugesetzt wurden.

Das FCS wurde vor Verwendung hitzeinaktiviert (45 min 56 °C).

### 2.5.3 Kultivierung von Zelllinien

Für die Kultivierung wurden Zellkulturflaschen verschiedener Größe (Greiner) und Zellkulturplatten (6, 24 oder 96 Vertiefungen, Nunc) verwendet. Die Kultivierung von murinen Zelllinien und Hybridomen erfolgte in Begasungsbrutschränken, in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. RBL-1 (ATCC, CRL-1378) und Y3-Ag 1.2.3 (ATCC, CRL-1631) Zellen wurden in R10F<sup>+</sup>/β-ME/AS/Pyr kultiviert, L-Zellen (Rissoan *et al.*, 1996) und P3x63Ag8.653 (ATCC, CRL-1580) in R10F<sup>+</sup>/β-ME. Die Kultivierung der SL3 Insektenzellen (Schneider, 1972) erfolgte bei 27 °C unter Normalatmosphäre, in SFX<sup>+</sup> mit 3 % FCS.

### 2.5.4 Präparation primärer Zellen

Zur Isolierung von Zellen aus Milzen, Lymphknoten oder Thymi wurden die Organe zerkleinert und durch 212 µm Metallsiebe bzw. 70 µm Nylon-Zell-Siebe (BD Falcon, Bedford USA) gedrückt. Erythrozyten in den Milzzellen wurden durch 1-minütige Inkubation in ACK-Puffer (0,15 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,2–7,4) lysiert. Die Zellen wurden erneut über 70 µm Nylon-Zell-Siebe gegeben und entsprechend der weiteren Verwendung in FACS-PBS, MACS-PBS oder Zellkulturmedium aufgenommen. Zur Zellzählung wurde das Zellzählgerät Guava<sup>®</sup>PCA (Guava Technologies) verwendet. Dazu wurden die Zellen in Viacount Reagenz (2,5 µg/ml LDS-751, 1 µg/ml Propidiumiodid, 5 mM EDTA, 0,05% NaN<sub>3</sub>, in PBS, pH 7,2) verdünnt, und die Anzahl lebender, nukleärer Zellen mittels der ViaCount Software (Guava Technologies) ermittelt.

### 2.5.5 Durchflusszytometrie

#### 2.5.5.1 Verwendete Farbstoffe

**Tab. 4: Übersicht der genutzten Fluorochrome**

Angabe der Wellenlänge des Lasers zur Anregung der Fluorochrome, sowie die zur Detektion im jeweiligen Durchflusszytometer (LSRII und FACSCalibur, BD) verwendeten Filter. Abk.: BP: Bandpassfilter, LP: Langpassfilter. Emissionsmaxima wurden zusammengestellt mit Daten von BD Biosciences, Zeiss und Molecular Probes

Fluorochrom	Anregungs- wellenlänge (nm)	Emissions- maximum (nm)	BP Filter (LSRII)	Filter (FACSCalibur)
FITC, CFSE	488	525	530/30	BP 530/30
PE	488	575	585/42	BP 585/42
PI	488	620		LP ≥ 670
PerCP/ PE-Cy5.5	488	675/695	685/40	
PE-Cy7	488	767	780/60	
A647/Cy5/APC	633	665/667/660	670/14	BP 661/16
A700	633	723	720/30	
APC-Cy7	633	767	780/60	
Pacific Blue/DAPI	405	451/460	440/40	
Cascade Yellow/ DAPI	405	558/460	562/40	
Pacific Orange	405	551	562/40	

#### 2.5.5.2 Kopplung an Fluoreszenzfarbstoffe

Die anti-BTLA mAK und andere laboreigene Antikörper (Tab. 1) wurden nach Standardmethoden an Haptene (Digoxigenin, Biotin) oder andere Fluorochrome gekoppelt (Brinkley, 1992; Oi *et al.*, 1982; Goding, 1996; Kronick, 1986; Roederer *et al.*, 1997).

Die anti-BTLA mAK wurden u. a. direkt mit Dig-NHS (Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- $\epsilon$ -aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester, Roche) konjugiert und anschließend über Gelfiltration (PD10-Säulen, Pharmacia) abgetrennt. Für die Kopplung an Phycoerythrin (PE) wurde über SMCC (Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat; Pierce, Rockford, IL) aktiviertes R-Phycoerythrin (Cyanotech, Kailua-Kona, HI) verwendet (Oi *et al.*, 1982). Die Aufreinigung der Konjugate erfolgte über eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule (XK16/60-Säule, Pharmacia). In Tab. 4 sind alle für die Durchflusszytometrie verwendeten Fluorophore dargestellt.

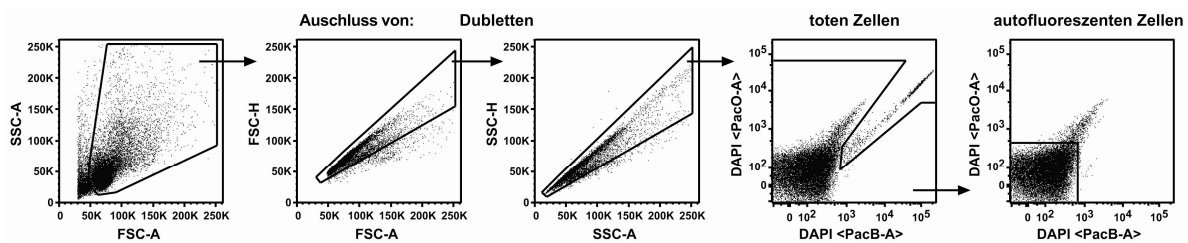
#### 2.5.5.3 Oberflächenfärbung von Antigenen

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit die Zelloberflächenexpression von Proteinen auf Einzelzellebene zu analysieren (Radbruch, 2000). Die Färbung von  $0,3\text{--}4 \times 10^6$  Zellen wurde in Rundbodenmikrotiterplatten (Nunc) durchgeführt. Die Zellen wurden vor der Antikörperinkubation 5 min auf Eis mit  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  anti-CD16/CD32 (Klon 2.4G2),  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$  Ratten IgG (Nordic) in FACS-PBS inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen an Fc-Rezeptoren zu minimieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit in FACS-PBS verdünnten Antikörpern für 20 min auf Eis. Es wurden sowohl direkt an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte als auch Biotin- und Digoxigenin (DIG)-gekoppelte mAK verwendet. Die Detektion der Biotin- bzw. DIG-gekoppelten Primärantikörper erfolgte mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Streptavidin bzw. anti-DIG Antikörper (5 min bzw. 20 min auf Eis). Die Antikörper, die für die Oberflächenfärbung verwendeten wurden, sind in Tab. 1 aufgeführt. Die Färbung mit HVEM-Ig wurde mit  $20\text{ }\mu\text{g/ml}$  durchgeführt und der humane Fc-Teil des Fusionsproteins mit Ziege-anti-huIgG Fc $\gamma$ -spezifischem-Cy5 Sekundärreagenz (Dianova) detektiert. Zur Identifizierung der toten Zellen wurden kurz vor der Messung im Durchflusszytometer die DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumiodid ( $0,33\text{ }\mu\text{g/ml}$ ; PI; für FACSCalibur) oder 4', 6-Diamidino-2-Phenylindol ( $0,33\text{ }\mu\text{g/ml}$ , DAPI; Roche) zugesetzt. Die intakte Zellmembran lebender Zellen verhindert das Eindringen dieser Farbstoffe. Die PI<sup>+</sup>- oder DAPI<sup>+</sup>-Zellen (tot) wurden in der Auswertung der Daten ausgeschlossen.

#### 2.5.5.4 Messung und Auswertung

Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgte am LSRII-Durchflusszytometer unter Verwendung der Software BD FACSDiva oder am FACSCalibur mit der Aufnahme-Software CellQuest

Pro (Geräte und Software von BD Biosciences). Zur Auswertung der Daten wurde die Software FlowJo (Tree Star Inc.) verwendet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Histogramm oder *Dot Plot*, wobei die Zahlen den prozentualen Anteil der in den Gates enthaltenen Zellen angeben, wenn nicht anders angegeben bezogen auf die dargestellte Population. Die standardmäßig durchgeführte Analysestrategie ist in Abb. 3 gezeigt. Es wurde eine geeignete Eingrenzung der Zellen im Vorwärts- und Seitwärtsscatter als auch ein Ausschluss der toten Zellen über PI bzw. DAPI vorgenommen. Autofluoreszente Zellen wurden zur Analyse der Lymphozytenpopulationen ebenfalls ausgeschlossen. Bei allen am LSRII gemessenen Proben wurden zusätzlich Dubletten in der Höhe und Fläche der Vorwärts- und Seitwärtsscatters für die weitere Analyse ausgeschlossen. Dieses Vorgehen war für alle Experimente gleich und wird in späteren Abbildungen nicht mehr gezeigt.



**Abb. 3: Durchflusszytometrische Analyse**

Im Durchflusszytometer gemessene Zellen wurden im Vorwärts (FCS)- und Seitwärtsscatter (SSC) eingegrenzt, anschließend erfolgte die Ausgrenzung der Zelldubletten, deren Größe bezüglich der Höhe (-H) und Fläche (-A) der Seitwärts- und Vorwärtsscattersignale nicht proportional zunahm. Weiterhin wurden tote Zellen (DAPI<sup>+</sup> bzw. PI<sup>+</sup>), sowie autofluoreszente Zellen ausgeschlossen. DAPI (4',6-Diamidine-2-phenylindole) wurde sowohl über die Detektoren für PacB (Pacific Blue) als auch PacO (Pacific Orange) detektiert. Die dargestellte Analysestrategie wurde für alle Auswertungen benutzt und wird daher in den nachfolgenden Abbildungen nicht mehr gezeigt.

### 2.5.6 Anreicherung von T-Zellen über Nylonwolle

Zur Anreicherung von T-Zellen aus Splenozyten wurden Nylonwoll-Säulen verwendet (Eisen *et al.*, 1972). Die Nylonwolle (PolySciences Nylon wool fibre) wurde in 0,1 M HCl vorgewaschen, gründlich mit Wasser gespült und anschließend getrocknet. 3 g trockene Nylonwolle wurde mit Bürsten aufgelockert und in eine 50 ml Plastikspritze (BD, Bedford USA) gestopft. Je nach Bedarf wurden die Säulen vor der Verwendung autoklaviert. An die Spritze wurde ein 2-Wege Sperrhahn angebracht. Vor dem Auftragen der Zellen wurde die Nylonwoll-Säule mit PBS gespült und mit vorgewärmtem R10F<sup>+</sup>/β-ME/AS/Pyr äquilibriert. Bis zu  $600 \times 10^6$  Splenozyten wurden in R10F<sup>+</sup>/β-ME /AS/Pyr auf eine Säule gegeben und für

45 min bei 37 °C im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 90 ml, 37 °C warmen R10F<sup>+</sup>/β-ME/AS/Pyr eluiert. Dazu wurde eine stumpfe 21G Kanüle (Braun) an die Säule angebracht. Durch diese Methode wurden die T-Zellen aus der Milz gewöhnlich auf 65–75 % angereichert.

### **2.5.7 Magnetische Zellsortierung**

Bei der magnetischen Sortierung (MACS, *Magnetic Activated Cell Sort*) werden Zellen aus einer komplexen Zellsuspension über spezifische Antikörper gegen Oberflächenantigene mit paramagnetischen Partikeln (*Beads*) markiert. Die Separation der Zellen erfolgte über magnetisierbare Säulen in einem Magnetfeld. Dabei fließen die unmarkierten Zellen durch, während die Zellen, die mAK mit *Beads* gebunden haben, im magnetischen Feld auf der Säule verbleiben. Nach Entfernen der Säule aus dem Magneten können auch diese Zellen eluiert werden (Miltenyi *et al.*, 1990). Die Sortierung von B-Zellen aus Splenozyten erfolgte durch Depletion von CD11c-, NK1.1-, Ly6G/C- und Thy-1-positiven Zellen. T-Zellen wurden aus Splenozyten oder Nylonwollzellen (Kap 2.5.6) durch Depletion der B220-, CD11b-, CD11c-, und NK1.1-positiven Zellen sortiert. Um CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen zu erhalten, wurde zusätzlich die jeweils andere Population ebenfalls depletiert. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml mit den biotinylierten mAK gegen die entsprechenden Antigene (Tab. 1) in der optimalen Verdünnung in MACS-PBS für 15 min auf Eis inkubiert, anschließend mit anti-Biotin MicroBeads (Miltenyi Biotech). Um naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu erhalten, wurden in einer zweiten magnetischen Zellsortierung die CD62L<sup>high</sup> Zellen mittels anti-CD62L MicroBeads (Miltenyi Biotech) positiv sortiert. Alle Inkubationen mit *Beads* erfolgten mit  $2 \times 10^8$  Zellen/ml für 15 min bei 4 °C. Bei der Sortierung von B-Zellen und CD62L<sup>high</sup> Zellen wurden die Zellen in  $1 \times$  Fc-Block inkubiert, um unspezifische mAK-Bindung zu verhindern. Die Zellen wurden dann über die LS-Säulen im Magneten (MidiMACS<sup>®</sup>, Miltenyi Biotec) separiert. Für die negativen Zellsortierungen durch Depletion wurde zur Verlangsamung der Tropfgeschwindigkeit eine 22 G-Kanüle (Braun) an der Säule angebracht. Die Äquilibration, der Probenaufrag und die Elution erfolgten nach Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotech). Die Reinheit der sortierten Population wurde durchflusszytometrisch überprüft. Sie lag in der Regel über 97 % bei T-Zellen und für B-Zellen bei ca. 90 %.

### **2.5.8 In vitro Stimulation von T- und B-Zellen**

Gereinigte B-Zellen wurden *in vitro* mit 10 ng/ml Phorbol-myristataacetat (PMA, Sigma) und dem Ca-Ionophor Ionomycin (1 µg/ml, Sigma) für die angegebenen Zeiten stimuliert.

Weiterhin wurden für die B-Zellstimulation anti-IgM mAK (Klon Bet-2), anti-CD40 mAK (Klon FGK, (Rolink *et al.*, 1996) oder polyklonales Kaninchen-anti-Maus Ig (Sigma) mit jeweils 10 µg/ml eingesetzt oder 5 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS, Sigma).

Gereinigte T-Zellen oder T-Zellsubpopulationen (je  $10^5$  Zellen in 200 µl R10F<sup>+</sup>/β-ME/AS/Pyr) wurden auf *High-Protein-Binding* 96-Well EIA/RIA Platten (Costar) mit verschiedenen Konzentrationen (in der Abbildung angegeben) immobilisiertem anti-CD3 mAK (145-2C11, BD Pharmingen) in Gegenwart von 4 µg/ml anti-CD28 mAK (Klon 37.51, (Gross *et al.*, 1992) oder einer syrischen Hamster IgG-Isotypkontrolle (eBioscience) *in vitro* stimuliert. Die Bindung der mAK an die Platten erfolgte durch Inkubation in PBS über Nacht. Die Zellen wurden bei 37 °C für die angegebenen Zeitpunkte kultiviert. Um durch HVEM vermittelte Effekte auf die T-Zellaktivierung zu untersuchen, wurde zusätzlich zum anti-CD3 mAK auch HVEM-Ig Fusionsprotein oder humanes Kontrollimmunglobulin (Endobulin, Baxter, Heidelberg) mit einer Konzentration von 4 µg/ml auf die Platten gebunden. Für einige Experimente wurden die Zellen zuerst für die angegebenen Zeiten auf einer Platte inkubiert, danach gewaschen und auf einer anderen Platte weiterkultiviert.

### **2.5.9 Proliferationsanalyse**

Zur Analyse der Zellteilung wurden Zellen mit CFSE (5- und 6-Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester, Molecular Probes) markiert. Dieser fluoreszierende Farbstoff dringt in die Zellen ein, wo die lipophilen Gruppen des Moleküls von unspezifischen Esterasen abgespalten werden. Dadurch verbleibt der Farbstoff in der Zelle und wird bei jeder Zellteilung zu gleichen Anteilen an die Tochterzellen weitergegeben. So kann durch Verringerung des CFSE-Signals die Anzahl der Zellteilungen abgeleitet werden (Lyons und Parish, 1994). Für die Markierung wurden die Zellen bei einer Zelldichte von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml mit 5 µM CFSE in PBS + 0,1 % BSA für 10 min bei 37 °C inkubiert.

## **2.6 Transfektion eukaryotischer Zelllinien**

### **2.6.1 Murine Zelllinien**

Es wurden verschiedene murine Zelllinien durch Elektroporation (GenePulser, BioRad, München) transfiziert. Für die Elektroporation wurden die Zellen mit 40 µg des entsprechenden Plasmids für 10 min bei RT inkubiert und unter den in Tab. 5 dargestellten Bedingungen transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und 24 h kultiviert (Kap. 2.5.3). Stabile Transfektanten wurden über



eine ebenfalls auf den Plasmiden kodierte Antibiotikumresistenz gegen Geneticin (G418, Invitrogen) selektiert (Colbere-Garapin *et al.*, 1981). Die Zellen wurden in einer 96er-Flachbodenplatten ausgesät (RBL-1 und Y3-Ag:  $5 \times 10^4$ /Loch; L-Zellen:  $1 \times 10^4$ /Loch und  $0,5 \times 10^4$ /Loch). Nach ca. zwei Wochen wurde zur Beurteilung des Transfektionserfolges die BTLA-Expression der jeweils erhaltenen Zellklone auf RNA-Ebene untersucht (Kap. 2.4.4). Folgende BTLA-Transfektanten wurden in dieser Arbeit eingesetzt: RBL-1 und L-Zellen transfiziert mit BCMGS<sub>neo</sub>-BTLA (RBL-1/BTLA, Klon 5 und 10; L-Zellen/BTLA, Klon 1 und 9) und Y3-Ag 1.2.3 transfiziert mit pcDNA3-BTLA-YFP (Y3-Ag/BTLA-YFP, Klon 5).

**Tab. 5: Transfektionsbedingungen zur Generierung stabiler BTLA-Transfektanten**

Zelllinie	verwendetes Plasmid	eingesetzte Zellzahl	Elektroporationsbedingungen	eingesetzte Menge G418
RBL-1	BCMGS <sub>neo</sub> -BTLA	$10 \times 10^6$	1300 V, 25 $\mu$ F	0,75 mg/ml
	pcDNA3-BTLA-YFP	$10 \times 10^6$	1300 V, 25 $\mu$ F	0,75 mg/ml
Y3-Ag	BCMGS <sub>neo</sub> -BTLA	$10 \times 10^6$	1600 V, 25 $\mu$ F	0,75 mg/ml
	pcDNA3-BTLA-YFP	$10 \times 10^6$	1600 V, 25 $\mu$ F	0,75 mg/ml
L-Zellen	BCMGS <sub>neo</sub> -BTLA	$2 \times 10^6$	1300 V, 25 $\mu$ F	0,50 mg/ml
	pcDNA3-BTLA-YFP	$2 \times 10^6$	1300 V, 25 $\mu$ F	0,50 mg/ml

### 2.6.2 Drosophila Zelllinie

Die Transfektion der SL3 Zellen wurde in Anlehnung an in der Literatur beschriebene Methoden durchgeführt (Cherbas *et al.*, 1994) und erfolgte mit Cellfectin (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Es wurden 2  $\mu$ g des Plasmids pRmHa3-MT-HVEM-huIgG1 und 140 ng phshs.PURO (Selektionsplasmid mit Antibiotikumresistenz für Puromycin, von M. McKeown, Salk Institute) kotransfiziert. Die Zellen wurden mit dem Transfektionsmix (Plasmide und Cellfectin in SFX<sup>+</sup>-Medium) 24 h bei 27 °C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von SFX<sup>+</sup>-Medium mit 3 % FCS. 24 h später wurden die transfizierten SL3 Zellen vereinzelt, untransfizierte SL3 Zellen wurden als *Feeder*-Zellen verwendet. Die Kultivierung erfolgte in SFX<sup>+</sup> mit 3 % FCS und 6  $\mu$ g/ml Puromycin (Calbiochem) zur Selektion. Nach drei bis vier Wochen, wurden makroskopisch sichtbare Zellkolonien auf Produktion des Fusionsproteins untersucht. Dazu wurde ein Teil der Zellen mit 1 mM CuSO<sub>4</sub> induziert (MT-Promotor). Nach vier Tagen wurden die Überstände der induzierten Zellen mittels ELISA (Kapitel 2.6.3) analysiert.

### 2.6.3 Selektion von HVEM-Fusionsproteinproduzenten

Die Selektion von Zellen, die das Fusionsprotein produzierten, erfolgte durch Quantifizierung von humanem IgG im Zellkulturüberstand mittels Sandwich-ELISA. 96er-Mikrotiterplatten (MaxiSorb, Nunc) wurden mit Ziege-anti-huIgG (TAGO Immunologicals) in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet. Freie Bindungsstellen wurden durch einstündige Inkubation mit PBS, 3 % BSA (Fraktion V, Serva, Heidelberg) abgesättigt. Anschließend wurden für 2 h mit den verdünnten Proben und der Standardverdünnungsreihe inkubiert, danach für 1 h mit biotinyliertem Ziegen-anti-huIg (TAGO Immunologicals) in PBS, 5 % FCS. Gebundenes Biotin wurde durch Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*, Dianova) detektiert (Verdünnung in PBS, 5 % FCS, 30 min). Die Inkubationen erfolgten bei RT, zwischen den einzelnen Schritten wurden drei- bis achtmal mit PBS, 0,1 % TWEEN 20 (Sigma) mit einem ELISA-Washer (Tecan, Crailsheim) gewaschen. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl TMB-Lösung (1 Tablette 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich) gelöst in 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 M Zitronensäure, pH 5 + 0,006 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und wurde nach 3–10 min durch Zugabe von 100 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt. Die Platten wurden in einem Mikrotiterplattenphotometer (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA) bei 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) vermessen und die Daten mit dem Programm Revelation (Life Science) ausgewertet.

Proben: induzierte Zellkulturüberstände, 1:800 verdünnt in Medium

Standard: huIgG (Serum, Sigma), 80–0,078 ng/ml (1:1 serielle Verdünnung in Medium)

Klone, die zwischen 3 und 30 µg/ml Fusionsprotein produzierten, wurden selektiert, und ausgehend von den restlichen nicht induzierten Zellen weiter kultiviert und eingefroren.

### 2.6.4 Reinigung von HVEM-huIgG1 aus dem Zellkulturüberstand

Der SL3-Zellklon mit der stärksten Fusionsproteinproduktion wurde in SFX<sup>+</sup>-Medium mit 1 % FCS (gereinigt über Protein G Sepharose Chromatographie) und 5 µg/ml Puromycin bis zu einem Volumen von 3 l kultiviert. Bei einer Zelldichte von ca.  $2 \times 10^6$  Zellen/ml wurde zur Induktion der HVEM-huIgG1-Produktion 1 mM CuSO<sub>4</sub> zugesetzt. Nach 5–7 Tagen wurde der Überstand durch zweimalige Zentrifugation (15 min, 1000 g und 15 min, 14000 g) geerntet. Anschließend wurde der Überstand durch einen Seitz-K 300-Filter, 140 cm und danach mit einem Seitz EKS Tiefenfilter, 140 cm (Seitz Filterwerke, Bad-Kreuznach) filtriert. Die Reinigung von HVEM-huIgG1 erfolgte über eine mit GammaBind Plus Sepharose (10 ml, Amersham Life Science) gefüllte Chromatographiesäule (Econo-Pac, BioRad), gebundenes Fusionsprotein wurde mit 100 mM Glycin, pH 2,7 eluiert. Das Eluat wurde durch Zugabe von

1 M Tris pH 9,0 neutralisiert, anschließend dreimal gegen PBS über ca. 30 h dialysiert (Dialyseschlauch, Molekulargewichtsausschluss 12 kDa, Sigma-Aldrich) und steril filtriert (0,22 µm Sartorius). Die Proteinkonzentration wurde am Nanodrop ND-1000 Spektrometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) bestimmt. Die biochemischen Eigenschaften des gereinigten HVEM-Fusionsproteins wurden mittels Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft (Ergebnis nicht gezeigt).

## **2.7 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen BTLA**

Die Herstellung von Antikörpern mit Hilfe der Hybridomtechnik (Kohler und Milstein, 1975) erfordert eine Immunreaktion *in vivo* gegen das BTLA-Molekül, d.h. es muss in entsprechenden Tieren als fremdartiges Antigen erkannt werden. Nach Immunisierungen können antikörperproduzierende B-Zellen aus der Milz mit Myelomzellen fusioniert werden, um so Hybridomzelllinien zu erhalten, die *in vitro* AK produzieren. Je nach Effizienz der Immunisierung sind darunter auch BTLA-spezifische AK.

### **2.7.1 Immunisierung**

Zur Generierung von BTLA-spezifischen mAK wurden sowohl Ratten als auch BTLA-defiziente Mäuse (Kap. 2.2) mit BTLA-transfizierten Zelllinien (Kap. 2.6.1) immunisiert. Dafür wurden entweder mit pcDNA3-BTLA-YFP transfizierte Y3-Ag.1.2.3 Zellen (Klon 5) verwendet, oder mit BCMGS<sub>neo</sub>-BTLA transfizierte RBL-1 Zellen (Klon 5 und 10, 1:1 gemischt). Vor der Injektion in die Tiere wurden die Zellen bestrahlt (1x 3000 rad). Die Immunisierung von Lewis, Wistar und CD-Ratten erfolgte durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von  $40 \times 10^6$  Zellen ohne Adjuvans. Die Mäuse wurden mit  $20 \times 10^6$  Zellen i.p. immunisiert, einer Maus wurden zusätzlich subkutan in die Flanke je Hinterbein weitere  $5 \times 10^6$  Zellen verabreicht. Nach der Primärimmunisierung erfolgten im Abstand von 3–6 Wochen weitere Injektionen zur Verstärkung der Immunantwort. Als Adjuvans für die intraperitonealen Injektionen der Mäuse wurden  $0.5 \times 10^9$  *B. pertussis*/ml verwendet, für die erste subkutane Immunisierung komplettes Freund-Adjuvans (Sigma-Aldrich), für die nachfolgende Immunisierung inkomplettes Freund-Adjuvans (Sigma-Aldrich). Einer Maus wurden bei der 3. Immunisierung statt Zelllinien negativ sortierte B-Zellen von C57BL/6 Mäusen (Kap. 2.5.7) gespritzt, also syngene Zellen, die im Vergleich zur immunisierten Maus nur zusätzlich BTLA auf der Oberfläche exprimierten (Kap. 3.2). Die Ratten wurden jeweils an den 2 Tagen, die Mäuse an den 3 Tagen vor der Fusion erneut immunisiert. In Tab. 6 sind die verschiedenen Immunisierungsstrategien zusammengefasst.

**Tab. 6: Übersicht der durchgeführten Immunisierungen zur Generierung von BTLA-spezifischen mAK**

Aufgeführt sind die Art der Zellen mit denen immunisiert wurde, der Injektionsort und die Anzahl der Immunisierungen vor den letzten 2 bzw. 3 unmittelbar vor der Fusion. Zusätzlich ist die Anzahl der erhaltenen Klone jeder Fusion mit angegeben, die fett-gedruckten Fusionsnummern sind die Fusionen, die Hybridome hervorbrachten, aus denen anti-BTLA mAK gereinigt wurden. RBL-1/BTLA = mit BCMGSneo-BTLA transfizierte RBL-1 Zellen, Klon 5 und 10 1:1 gemischt, Y3-Ag/BTLA = mit pcDNA3-BTLA-YFP transfizierte Y3-Ag.1.2.3 Zellen, Klon 5.

Fusion Nr.	Spezies	Stamm	Immunisierung			Analysierte Klone
			verwendete Zellen	Ort	Anzahl	
1	Ratte	Wistar	RBL-1/BTLA	i.p.	3	1921
2	Ratte	CD	RBL-1/BTLA	i.p.	4	1760
<b>3</b>	Ratte	Lewis	RBL-1/BTLA	i.p.	4	2200
4	Ratte	Wistar	Y3-Ag/BTLA	i.p.	5	2500
5	Ratte	Lewis	Y3-Ag/BTLA	i.p.	5	5800
<b>6</b>	Maus	BTLA <sup>-/-</sup>	RBL-1/BTLA	i.p. + s.c.	2	2200
7	Maus	BTLA <sup>-/-</sup>	RBL-1/BTLA	i.p.	3	710
8	Maus	BTLA <sup>-/-</sup>	2 × RBL-1/BTLA, 1 × C57BL/6 B-Zellen	i.p.	3	770

### 2.7.2 Fusion

Die Milzen der immunisierten Tiere wurden steril entnommen, die Splenozyten entsprechend Kap. 2.5.4 präpariert und in R10F<sup>-</sup>/β-ME resuspendiert. Parallel dazu wurden die Myelomzellen P3x63Ag8.653 zweimal mit R10F<sup>-</sup>/β-ME gewaschen und anschließend ebenfalls in R10F<sup>-</sup>/β-ME resuspendiert. Die Splenozyten wurden mit den Myelomzellen im Verhältnis 2:1 gemischt und pelletiert. Die Zellfusion erfolgte durch Polyethylenglykol (PEG 1500, Roche). Die Zellen wurden in 1 ml PEG 1500 resuspendiert, nach 1–2 min Inkubation wurde langsam mit 4 ml RPMI 1640 (ohne FCS) verdünnt. Nach Zugabe von weitere 10 ml RPMI 1640 wurden die Zellen für 5 min bei 37°C inkubiert, nach Zentrifugation (500 g, 5 min, RT, ohne Bremse) in R10F<sup>-</sup>/β-ME resuspendiert und bei 37°C im Wasserbad gelagert.

Aus 8–10 Wochen alten BALB/c Mäusen wurden Thymozyten entsprechend Kap. 2.5.4 präpariert und in R10F<sup>-</sup>/β-ME aufgenommen. Zur Kultivierung wurden die Hybridomzellen mit Thymozyten als *Feeder*-Zellen gemischt, in Selektionsmedium aufgenommen, jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen in 200 µl auf 96er-Flachbodenplatten verteilt und im Brutschrank inkubiert.

**Selektionsmedium** RPMI 1640 mit 20 % FCS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 50 U/ml IL-6 (Biosource, Camarillo, CA, USA), 1×AH (Aminopterin-Hypoxanthin, Sigma-Aldrich)

### **2.7.3 Screening der Hybridome**

Etwa 10–14 Tage nach der Fusion waren die Hybridome zu Kolonien herangewachsen, die makroskopisch zu sehen waren. Von diesen Hybridomen, wurden 100–150 µl Überstand abgenommen und in der Durchflusszytometrie auf BTLA-spezifische mAK getestet. Für diese Testung wurden die in Kapitel 2.6.1 beschriebenen mit BTLA-transfizierten Zelllinien verwendet. Die Überstände wurden mit den Zellen inkubiert, und gebundene Antikörper mit Ziege anti-Maus oder anti-Ratte-IgG Fcγ-spezifischen Sekundärreagenzien (Dianova) detektiert.

### **2.7.4 Kultivierung und Subklonierung von Hybridomen**

Hybridome, die die gewünschten Antikörper produzierten, wurden weiter kultiviert und mittels limitierender Verdünnung subkloniert. Dadurch wird gewährleistet, dass die Hybridome jeweils nur einem Klon entstammten, und tatsächlich monoklonale Antikörper produziert werden. Dafür wurden die Zellen in RPMI 1640 mit 20 % FCS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 5 U/ml IL-6 (Biosource, Camarillo, CA, USA), 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin so verdünnt, dass statistisch in jedes Well 30 Zellen gelangten. Von dieser Ausgangsverdünnung wurden vier weitere 1:3 Verdünnungen hergestellt und ebenfalls in 96er-Flachbodenplatten verteilt. Nach einer Woche wurden für die Analyse die Platten ausgewählt, auf denen in weniger als 20 der Vertiefungen Zellen gewachsen waren. Die Überstände der Subklone wurden wie in Kapitel 2.7.3 auf Antigen-Erkennung in der Durchflusszytometrie untersucht (Kapitel 2.5.5.3). In einigen Fällen waren bis zur Klonalität des Hybridoms mehrere Subklonierungen notwendig. Nach der Subklonierung wurden die Hybridome in R10F<sup>+</sup>/β-ME mit 5 U/ml IL-6 kultiviert. Für die Reinigung der mAK wurden die Hybridome bis zu einem Volumen von drei Litern in Rollerflaschen kultiviert, wobei ProteinG-gereinigtes FSC im Medium verwendet wurde.

### **2.7.5 Reinigung der monoklonalen Antikörper**

Ausgewachsene Hybridomkulturen (Kapitel 2.7.4) wurden zweimal zentrifugiert (15 min, 1000 g und 15 min, 14000 g) und der Überstand anschließend filtriert (0,2 µm Filter, Steritop, Millipore, Bedford, USA). Die Reinigung der mAK erfolgte über GammaBind Plus Sepharose (Amersham Life Science) wie bereits in Kapitel 2.6.4 beschrieben.

### **2.7.6 Isotypbestimmung der mAK**

Die Isotypen der gereinigten mAK wurden mittels ELISA bestimmt. Für den mAK aus der Ratte wurde der Rat Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit (BD Pharmingen) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Zur Isotypbestimmung der mAK aus der Maus wurden 96er-Mikrotiterplatten (MaxiSorb, Nunc) mit 7,5 µg/ml Ziege-anti-Maus Ig (50 µl, Southern Biotech Association) in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet. Freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit PBS, 1 % BSA (Fraktion V, Serva, Heidelberg) abgesättigt. Anschließend wurde mit 50 µl 0,15 µg/ml mAK inkubiert, danach mit HRP-gekoppelten Antikörpern gegen murines IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b oder IgG3 (SBA). Die Inkubationen erfolgten für jeweils 1 h bei RT, zwischen den einzelnen Schritten wurden drei- bis sechsmal mit PBS, 0,1 % TWEEN 20 (Sigma) gewaschen. Die Farbreaktion und anschließende Analyse der Platten erfolgte entsprechend Kap 2.6.3.

### **2.7.7 F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente**

Zur Generierung von F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten wurden die mAK in 0.1 M Citratpuffer, pH 3.5 für 4 h bei 37 °C mit Pepsin (Sigma) verdaut (Parham, 1983; Lamoyi und Nisonoff, 1983; Lamoyi, 1986). Nach Neutralisierung mit 2 M Tris/HCl, pH 8.0 erfolgte die Reinigung über eine Protein A Matrix (immobilized ProtA Plus, Pierce) nach Angaben des Herstellers, womit die Fc-Fragmente aber auch restliche vollständige mAK abgetrennt wurden. Die einzelnen Schritte des Verdaus und der Reinigung der Fab-Fragmente wurden mittels Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft (Ergebnis nicht gezeigt). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nanodrop ND-1000 Spektrometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA).

## **2.8 Immunhistochemie (IHC)**

### **2.8.1 Gewebepräparation, Kryoschnitte und Fixierung**

Zur Kryokonservierung wurden Lungen über die Trachea mit 50 % TissueTek (Electron Microscopy Sciences, Washington, DC, USA) in PBS perfundiert, entnommen, mit TissueTek auf einer Aluminiumfolie überschichtet, in 2-Methylbutan heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Lymphknoten wurden ebenso mit TissueTek überschichtet und entsprechend eingefroren. Alle anderen Gewebe wurden direkt nach der Entnahme in 0,9% NaCl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Gewebe wurden bei -70°C gelagert. Es wurden 8 µm Kryoschnitte angefertigt (Kryostat, 2800 Frigocut N, Reichert-Jung, Wien) die

auf silanisierte Objektträger aufgezogen und über Nacht bei RT getrocknet wurden. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte in Azeton fixiert (10 min, RT), getrocknet, entweder sofort gefärbt, oder zur Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Kryoschnitte der MCMV infizierten Speicheldrüsen stammen von C57BL/6 Mäusen die von M. Ganser während seiner Dissertation (Regulation und Funktion des ICOS-Liganden auf murinen Dendritischen Zellen, FU Berlin 2007), mit  $3 \times 10^5$  Pfu/Tier MCMV-GFP, Stamm Smith infiziert wurden. Die Organe wurden 15 Tage nach Infektion entnommen.

### **2.8.2 POD-Färbung**

Nach dem Auftauen wurden die Gewebeschnitte erneut in Azeton fixiert. Da die Detektion von gebundenen Antikörpern über HRP (*horseradish peroxidase*) erfolgte, wurde die endogene Peroxidaseaktivität, die vor allem von Granulozyten, Mastzellen und Erythrozyten ausgeht, zuvor durch Inkubation in Peroxidase-Blocklösung (1 mM Natriumazid, 10 mM Glukose, 1 U/ml Glukoseoxidase (Sigma-Aldrich) in PBS) für 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inhibiert. Alle folgenden Inkubationen erfolgten in einer Feucht-Kammer, zwischen den Antikörper-Inkubationen wurde jeweils dreimal 5 min in einer Küvette mit PBS + 0,05% Tween 20 und einmal kurz mit PBS gewaschen. Vor der Inkubation mit Antikörpern wurden durch NEN-Blocklösung unspezifische Bindungsstellen auf den Gewebeschnitten abgesättigt. Alle verwendeten Antikörper wurden zuvor titriert. Die Inkubation mit den FITC- bzw. Digoxigenin-gekoppelten Primärantikörpern erfolgte in NEN-Blocklösung über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Für die Detektion der Primärantikörper wurden Schaf-anti-FITC-HRP bzw. Schaf-anti-Digoxigenin-HRP (Roche) verwendet. Alle Sekundär-Antikörper wurden in NEN-Blocklösung verdünnt und die Inkubation erfolgte bei RT für 1–2 h. Gebundene HRP wurde durch Umsetzung des Farbstoffes 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) in ein rotbraunes Farbprodukt sichtbar gemacht. Die Inkubation mit AEC-Arbeitslösung erfolgte für ca. 5 min. Die Kerne wurden durch Hämatoxilin (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) gegengefärbt. Die Objektträger wurden mit Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckt und mit einem Deckglas abgeschlossen.

NEN-Blocklösung	PBS + 10% FCS + 0,5% NEN-Block (PerkinElmer Life Und Analytical Sciences, Wellesley, MA, USA)
AEC-Arbeitslösung	250 $\mu\text{l}$ AEC-Stammlösung, 4,75 ml 50 mM Natrium-Acetatpuffer pH 5; 2,5 $\mu\text{l}$ 30% $\text{H}_2\text{O}_2$ ; filtrieren (0,2 $\mu\text{m}$ )
AEC-Stammlösung	1 Tablette AEC (Sigma-Aldrich) in 2,5 ml DMF (N,N Dimethylformamid) gelöst

## 2.9 Tierexperimentelle Methoden

### 2.9.1 Adoptiver Zelltransfer

Zur Analyse der antigenspezifischen T-Zellaktivierung *in vivo* wurden jeweils  $2,5\text{--}3 \times 10^6$  OVA-TZR-transgene  $\text{CD4}^+$  T-Zellen aus OT-II Mäusen (Kap. 2.2) in syngene Mäuse transferiert. Die Zellen wurden in  $200\text{ }\mu\text{l}$  PBS intravenös (i.v.) in die Schwanzvene der Rezipiententiere injiziert. Erfolge der Transfer nur in C57BL/6 Mäuse, wurden aus Milzzellen der OT-II Tiere naive,  $\text{CD62L}^{\text{high}}$  Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) sortiert (Kap. 2.5.6), die Frequenz der transgenen T-Zellen ( $\text{CD4}^+ \text{Thy-1.1}^+ \text{TZRV}\alpha 2^+ \text{TZRV}\beta 5^+$ ) durchflusszytometrisch bestimmt und eine der Anzahl an transgenen T-Zellen entsprechende Zellzahl transferiert. Wurden als Rezipienten neben C57BL/6 wt-Mäusen auch HVEM-heterozygote oder vollständig HVEM-defiziente Mäuse verwendet, wurden nach Depletion von B220-, CD11b-, CD11c-, NK1.1- und CD8-positiven Zellen (Kap. 2.5.7) aus OT-II Splenozyten sortierte transgene  $\text{CD4}^+$  T-Zellen transferiert. Zur Analyse der Zellproliferation wurden die Zellen vor dem Transfer mit CFSE (Kap. 2.5.9) markiert.

### 2.9.2 Immunisierung

Zur Immunisierung der Mäuse wurde 24 h nach dem Transfer einerseits  $50\text{ }\mu\text{g}$  Alumpräzipitiertes OVA mit  $5 \times 10^7$  Hitze-inaktivierten *B. pertussis* (Chiron Behring) als Adjuvans subkutan in die Fußsohle injiziert, und zu den angegebenen Zeitpunkten die drainierenden poplitealen Lymphknoten analysiert. Systemische Immunisierungen erfolgten i.v. in die Schwanzvene mit entweder  $150\text{ }\mu\text{g}$  Endotoxin-freiem Ovalbumin ( $< 5\text{ pg}$  Endotoxin/mg Protein laut LAL-Test) oder  $15\text{ }\mu\text{g}$  Ovalbumin +  $3\text{ }\mu\text{g}$  LPS (Sigma). In diesem Fall wurden die Milzzellen der immunisierten Mäuse analysiert.

## 2.10 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen erfolgten mit der Prism Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). In den dargestellten Graphen stellt jedes Symbol ein Tier dar. Angegeben ist der Median für alle zugehörigen Tiere einer Gruppe und die Signifikanz im Falle eines Unterschiedes. Zur Berechnung der p-Werte wurde der Mann-Whitney U Test angewendet. Die Qualität der Signifikanz ist durch \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  und \*\*\*  $p < 0.001$  gekennzeichnet.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung von Reagenzien zur Charakterisierung des BTLA-Moleküls

##### 3.1.1 Generierung von BTLA-exprimierenden Zelllinien

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper (mAK) gegen Maus-BTLA, aber auch zur Charakterisierung von BTLA-spezifischen Reagenzien und Testsystemen (Kap. 3.1.2 bis 3.1.4) wurden Zelllinien generiert, die BTLA stabil auf der Zelloberfläche exprimierten. Dazu wurde mit molekularbiologischen Standardmethoden die cDNA aus C57BL/6 Milz-RNA in verschiedenen Vektoren kloniert und die rekombinante DNA in murine Zelllinien transfiziert. Zur Beurteilung des Transfektionserfolges wurde die BTLA-Expression der erhaltenen Zellklone auf RNA-Ebene mittels RNA *Dot-Blot* untersucht. Dabei wurde von einer Korrelation der detektierbaren Expression auf RNA-Ebene und der Proteinmenge auf der Zelloberfläche ausgegangen. Als zusätzliches Kriterium für Zellen, die mit Plasmiden transfiziert wurden, die für ein BTLA-YFP Fusionsprotein kodierten, wurde in der Durchflusszytometrie auf YFP-positive Zellklone selektioniert. Die Transfektionseffizienz (Tab. 7) unterschied sich je nach Zelllinie und verwendetem Plasmid.

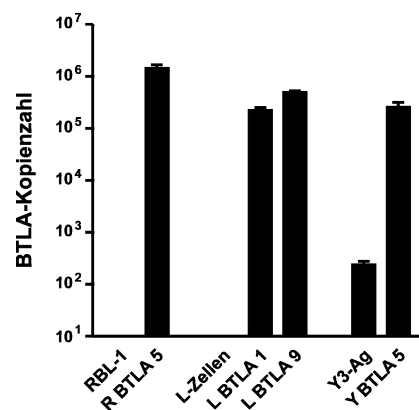
**Tab. 7: Übersicht der durchgeführten Transfektionen von Zelllinien mit BTLA**

Unterschiedliche Zelllinien wurden mit verschiedenen Plasmidkonstrukten (entweder BCMGS<sub>neo</sub>-BTLA oder pcDNA3-BTLA-YFP) transfiziert, und die durch Vereinzelung der Zellen entstandenen Zellklone mittels RNA Dot-Blot auf ihre BTLA-mRNA Expression hin untersucht.

Zelllinie	transfiziertes Plasmid	erhaltene Klone	positiv bzgl. BTLA-RNA Expression
RBL-1	BCMGS <sub>neo</sub> -BTLA	30	9
	pcDNA3-BTLA-YFP	100	0
Y3-Ag 1.2.3	BCMGS <sub>neo</sub> -BTLA	3	1
	pcDNA3-BTLA-YFP	30	2
L-Zellen	BCMGS <sub>neo</sub> -BTLA	30	4
	pcDNA3-BTLA-YFP	600	0

Die mittels quantitativer Real-Time-PCR bestimmte BTLA-Expression der in dieser Arbeit verwendeten Transfektanten ist in Abb. 4 mit den jeweiligen untransfizierten Zelllinien verglichen. Sowohl bei den von basophilen Rattenzellen abstammenden RBL-1-Zellen als

auch bei den aus Maus-Fibroblasten hervorgegangenen L-Zellen konnte erst nach erfolgter Transfektion eine BTLA-Expression nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie (> 85 % Identität der Nukleotidsequenzen) war die durchgeführte PCR auch geeignet zur Amplifikation von Ratten-BTLA, weshalb bereits in nicht transfizierten Y3-Ag, einer Zelllinie aus Ratten B-Lymphoblasten, ein Signal für BTLA detektiert werden konnte, das nach Transfektion aber deutlich stärker war. Das Fehlen von BTLA in den nicht transfizierten Zelllinien (im Gegensatz zur starken Expression in den Transfektanten) war für die Beurteilung der Spezifität von gegen BTLA gerichtete Reagenzien von Bedeutung.



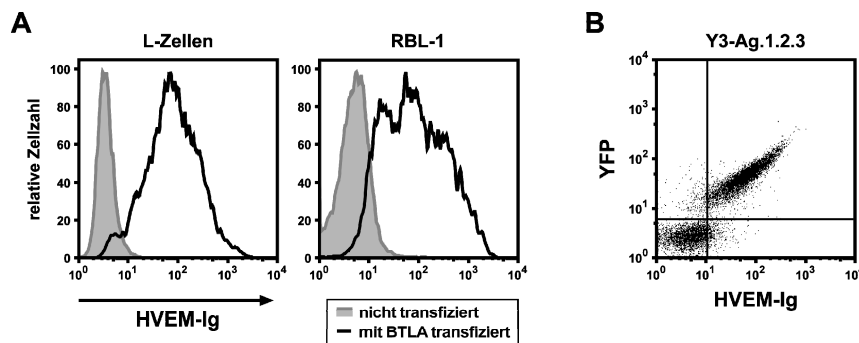
**Abb. 4: Expression von BTLA mRNA in den transfizierten Zelllinien**

Nach Präparation der RNA aus den entsprechenden Zellen wurde die Anzahl der Kopien der BTLA-mRNA mit TaqMan-PCR quantifiziert, die Kopienzahl bezieht sich dabei auf 0,1 µg RNA. Die Bestimmung erfolgte in Doppelwerten. Dargestellt sind sowohl die Ergebnisse der nicht transfizierten Zelllinien und der daraus generierten stabilen BTLA-Transfektanten (R = RBL-1, L = L-Zellen, Y = Y3-Ag 1.2.3).

### 3.1.2 Generierung eines HVEM-Fusionsproteins

Nachdem HVEM als Interaktionspartner für BTLA beschrieben wurde (Sedy *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2005), sollte für eine detaillierte Charakterisierung von BTLA auch dessen natürlicher Ligand experimentell zur Verfügung stehen. Daher wurde HVEM als Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne von murinem HVEM und dem Fc-Fragment von humanem IgG1 exprimiert und gereinigt. Das Vorliegen von HVEM in dieser Form bietet den Vorteil, dass es sowohl löslich, nach Immobilisierung aber auch Festphasen-gekoppelt eingesetzt werden kann. Somit ergeben sich unterschiedliche Anwendungsbereiche, die bis hin zu Untersuchungen der über HVEM vermittelten BTLA-Signale reichen. Über den humanen Fc-Teil ist zudem die Detektion von BTLA nach Bindung von HVEM-Ig möglich. Die Analyse der generierten BTLA-Transfektanten (Kapitel 3.1.1) im Durchflusszytometer (Abb. 5) ergab eine spezifische Färbung aller transfizierten Zelllinien mit dem HVEM-Fusionsprotein (HVEM-Ig). Dieses Ergebnis bestätigt einerseits die Bindung von HVEM an

BTLA und zeigt gleichzeitig, dass BTLA als Protein an der Zelloberfläche der transfizierten Zellen exprimiert wird.

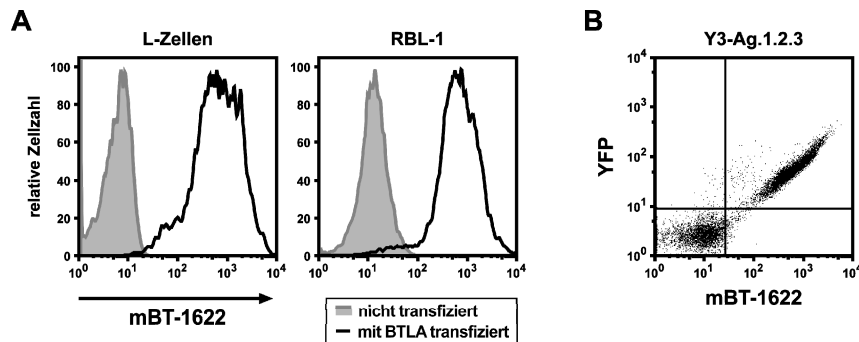


**Abb. 5: Spezifische Bindung von HVEM-Fusionsprotein an mit BTLA transfizierte Zelllinien**

Durchflusszytometrische Analyse der HVEM-Ig Bindung an BTLA-Transfektanten. Es wurden entweder sowohl die ursprüngliche Zelllinie (grau ausgefülltes Histogramm) als auch die stabile BTLA-Transfektante (schwarzes Histogramm) (A) oder nicht transfizierte Y3-Ag 1.2.3 Zellen gemischt mit den BTLA-YFP Transfektanten (B) mit HVEM-Ig inkubiert und die Bindung des Fusionsproteins mit anti-huIgG Fc $\gamma$  spezifischem Sekundärantikörper detektiert. Dabei war ausschließlich eine Bindung an die BTLA-transfizierte Zellen festzustellen.

### 3.1.3 Generierung von monoklonalen anti-BTLA Antikörpern

Die Grundvoraussetzung für die Charakterisierung von BTLA war der Nachweis des Moleküls in den verwendeten (immunologischen) Systemen. Da zu Beginn dieser Arbeit keine Reagenzien zur Detektion von BTLA zur Verfügung standen, sollten hochspezifische und hochaffine monoklonale Antikörper gegen murines BTLA generiert werden. Dafür wurden verschiedene Immunisierungsstrategien verwendet (Tab. 6). Zuerst wurden Ratten unterschiedlicher Stämme wiederholt mit BTLA-exprimierenden Transfektanten immunisiert. Um dabei die nicht relevanten Epitope, die ebenfalls vom Immunsystem erkannt werden würden, zu reduzieren, wurden hierfür die mit BTLA transfizierten syn- bzw. allogenen Rattenzelllinien verwendet. Die infolge der Immunreaktion gebildeten antikörperproduzierenden B-Zellen aus der Milz wurden mit Myelomzellen fusioniert. Um klonale Hybridomzelllinien zu erhalten, wurden die Zellen nach der Fusion auf Mikrotiterplatten vereinzelt. Die Überstände der Hybridomzellen wurden mit den BTLA-Transfektanten inkubiert und eine erfolgte Antikörperbindung mit Fc-spezifischen AK (IgG Fc- $\gamma$  spezifisch) mittels Durchflusszytometrie detektiert. Positive Überstände wurden ebenfalls auf den nicht transfizierten Zelllinien getestet. Im Fall der Y3-Ag 1.2.3 Zelllinie wurde immer ein Gemisch aus transfizierten und nicht transfizierten Zellen mit den Überständen gefärbt, da die Zellen durch die YFP-Expression zu unterscheiden waren. Aus 5 Fusionen konnte so ein BTLA-spezifischer mAK erhalten werden (Abb. 6).



**Abb. 6: Initiale Charakterisierung eines generierten BTLA-spezifischen mAK**

Spezifische Bindung des generierten Ratten-anti-Maus BTLA mAK an BTLA-Transfektanten. A) Es wurden jeweils die ursprüngliche Zelllinie (grau ausgefülltes Histogramm) und die transfizierten Zellen (schwarzes Histogramm) oder B) nicht transfizierte Y3-Ag 1.2.3 Zellen gemischt mit der BTLA-YFP Transfektante mit dem anti-BTLA mAK mBT-1622 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Ein Vergleich der BTLA-Sequenzen aus Maus und Ratte (Tab. 8) zeigte, dass auch auf Proteinebene eine hohe Sequenzhomologie (ca. 80 % Identität) vorliegt. Dies könnte eine geringe Immunogenität von Maus-BTLA in Ratten zur Folge haben, und so die geringe Ausbeute an BTLA-spezifischen AK erklären.

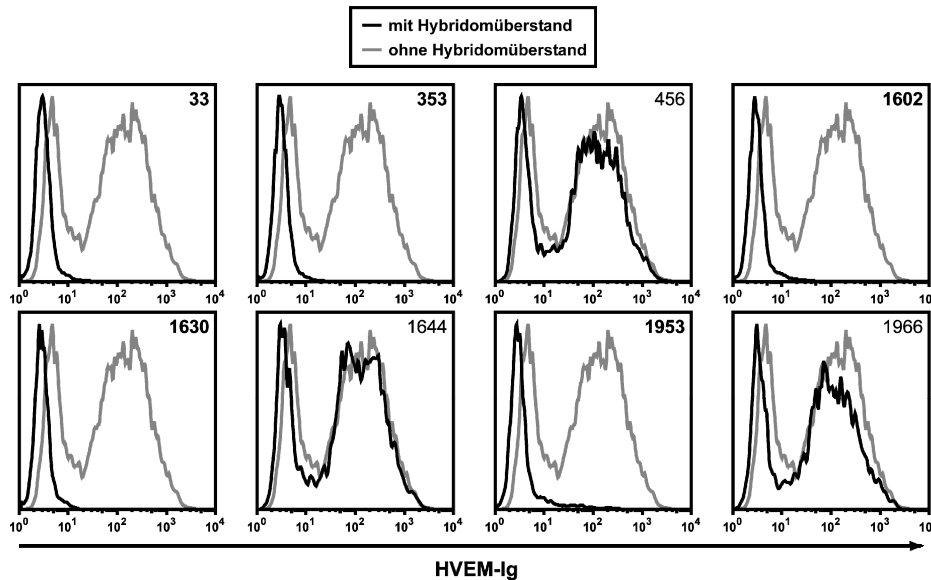
**Tab. 8: Vergleich der Aminosäuresequenzen von BTLA aus Maus, Ratte und Mensch.**

Die Sequenzen der BTLA Proteine aus *Mus musculus* (GenBank Eintrag NP\_808252), *Rattus norvegicus* (AAT00435) und *Homo sapiens* (NP\_861445) wurden mit dem ClustalW Algorithmus (MegAlign, DNASTar Lasergene 8) paarweise miteinander verglichen.

% Identität / % Divergenz	Spezies	<i>M. musculus</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>H. sapiens</i>
	<i>M. musculus</i>		80.0	55.0
	<i>R. norvegicus</i>	22.3		55.4
	<i>H. sapiens</i>	67.3	66.5	

Aus diesem Grund wurden ebenfalls Immunisierungen von BTLA-defizienten Mäusen durchgeführt. Das Fehlen von BTLA in den immunisierten Tieren sollte eine starke Immunantwort inklusive Antikörperreaktion gegen die injizierten BTLA-exprimierenden Zellen auslösen. Schon aus einer Fusion wurden so mehr als 100 Hybridome erhalten, die spezifisch die mit BTLA-transfizierten Zelllinien anfärbten (nicht gezeigt). Die große Menge an positiven Hybridomen war Anlass für die Verwendung eines neuen Selektionskriteriums für die Hybridomüberstände. Diese wurden auf eine Blockade der Bindung zwischen BTLA und dessen Ligand hin untersucht. Dafür wurde getestet, ob auch nach Inkubation mit den Hybridomüberständen eine Bindung von HVEM-Ig an BTLA-Transfektanten erfolgen kann. Mit fünf der 114 positiven Überstände war keine Färbung des Fusionsproteins mehr

detektierbar (Abb. 7). Diese fünf Hybridome, wie auch das eine Hybridom aus der Rattenmilzfusion wurden subkloniert, danach expandiert und die mAK aus den Zellkulturüberständen über Protein G Sepharose gereinigt. Es wurden zwei weitere Fusionen mit Milzen der BTLA-defizienten Mäuse durchgeführt, aus denen jedoch keine weiteren blockierenden mAK erhalten wurden.



**Abb. 7: Analyse der anti-BTLA AK auf Blockade der HVEM-Fusionsproteinbindung**

Durchflusszytometrische Analyse der HVEM-Ig Bindung an BTLA-Transfektanten mit (schwarzes Histogramm) und ohne (graues Histogramm) vorherige Inkubation der Zellen mit anti-BTLA AK produzierenden Hybridomüberständen. Es wurden BTLA-transfizierte L-Zellen gemischt mit der wt Zelllinie verwendet und die Bindung des HVEM-Fusionsproteins wie in Abb. 5 beschrieben detektiert. Dargestellt sind die Ergebnisse der fünf als blockierend identifizierten und später aus Hybridomüberständen gereinigten mAK (Klone 33, 353, 1602, 1630 und 1953), sowie exemplarisch 3 der mehr als 100 restlichen Hybridomüberstände.

### 3.1.4 Charakterisierung der anti-BTLA Antikörper

Es wurden verschiedene Eigenschaften der generierten anti-BTLA mAK, wie Spezifität, Bindungsstelle und Bindungsstärke untersucht, der Antikörperisotyp wurde mittels Immunglobulinsubklassen-ELISA bestimmt. Der Ratten-mAK mBT-1622 war vom Isotyp IgG2b, alle mAK aus der Maus (mBT-33, -353, -1602, -1630 und -1953) vom Isotyp IgG2a. Im Hinblick auf weiterführende Studien wurde ebenso die Möglichkeit der Generierung von  $F(ab')_2$ -Fragmenten; sowie die Eignung der Antikörper für zwei zentrale Methoden der Immunologie, die Durchflusszytometrie und Immunhistochemie (IHC) getestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 zusammengefasst.

**Tab. 9: Übersicht der in dieser Arbeit generierten anti-BTLA mAK**

Die aus 2 Fusionen gereinigten Hybridome wurden auf Blockade der HVEM-Bindung, sowie ihre Eignung für die Durchflusszytometrie (FACS) und die Immunhistochemie (IHC) getestet, (+ = für Anwendung geeignet)

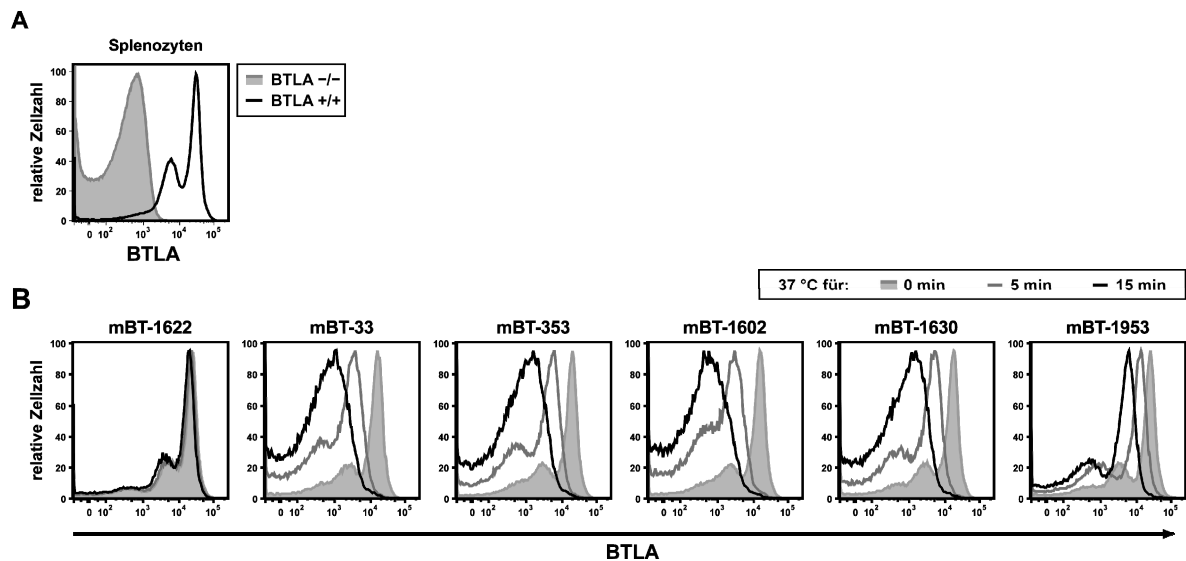
Fusion Nr.	Anzahl analysierter Klone	anti-BTLA IgG	Klon gereinigt aus Hybridom-Überstand	Isotyp	Blockade HVEM-Ig Bindung	FACS	IHC
3	2200	1	1622	Ratte IgG2b	–	+	+
6	2200	114	33	Maus IgG2a	+	+	–
			353		+	+	–
			1602		+	+	–
			1630		+	+	–
			1953		+	+	–

#### 3.1.4.1 Spezifität und Affinität der anti-BTLA mAK

Für die Anwendung der BTLA-mAK war es vor allem wichtig, deren Spezifität zu verifizieren. Die Kopplung an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichte dabei die bessere Detektion der Antikörper. Zusätzlich zu den bereits mit den Hybridomüberständen getesteten Zelllinien wurden auch primäre Zellen analysiert. Hierfür wurden murine Splenozyten verwendet, da eine starke mRNA Expression von BTLA in der Milz bereits beschrieben wurde (Watanabe *et al.*, 2003). Die gereinigten mAK färbten, wie schon die Hybridomüberstände, spezifisch die mit BTLA transfizierten Zelllinien (nicht gezeigt, Vgl. Abb. 6). Hinzu kommt eine deutliche BTLA-Färbung auf C57BL/6 Splenozyten, die im Gegensatz dazu auf Zellen aus BTLA-defizienten Mäusen nicht mehr detektierbar war (Abb. 8 A, exemplarisch gezeigt für den mAK mBT-1622). Auf die BTLA-Expression auf primären Zellen wird in Kapitel 3.2.2 genauer eingegangen.

Um die Affinität der anti-BTLA mAK abzuschätzen, wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie einerseits die Bindung an BTLA exprimierende Zellen, andererseits auch die Dissoziation der Antikörper von diesen Zellen analysiert und verglichen. Die optimale Konzentration für die Bindung an BTLA lag für alle Antikörper bei 10–20 nM, jedoch konnte das Molekül auch noch mit 10-fach geringeren Konzentration gut detektiert werden. Im Vergleich dazu war für eine optimale Färbung mit dem HVEM-Fusionsprotein etwa 200 nM nötig. Die Färbeeigenschaften aller generierten mAK in der Durchflusszytometrie (Intensitäten und Signaltrennungen) waren vergleichbar, allerdings ergaben sich deutliche Unterschiede bei der Stabilität der Antikörperbindung. Nach Färbung der Zellen mit den mAK bei optimaler Konzentration wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert, und die noch vorhandene Bindung der mAK nach unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Wie in Abb. 8 B erkennbar,

war bei vier der Maus-mAK bereits nach 5 min bei 37 °C ein erheblicher Intensitätsverlust (4–5fach geringere MFI) der BTLA-Färbung zu verzeichnen, nach weiteren 10 min konnte so gut wie kein gebundener mAK mehr detektiert werden. Eine geringere Abnahme der Färbintensität trat bei dem mAK mBT-1953 auf ( $\frac{1}{2}$  der anfänglichen MFI nach 5 min,  $\frac{1}{4}$  nach 15 min). Verglichen mit den mAK aus der Maus war die Bindung von mBT-1622 an BTLA sehr stabil. Auch nach 15 min bei 37 °C konnte hier nahezu die ursprüngliche Menge an gebundenem mAK detektiert werden.



**Abb. 8: Spezifität und Affinität der generierten anti-BTLA mAK**

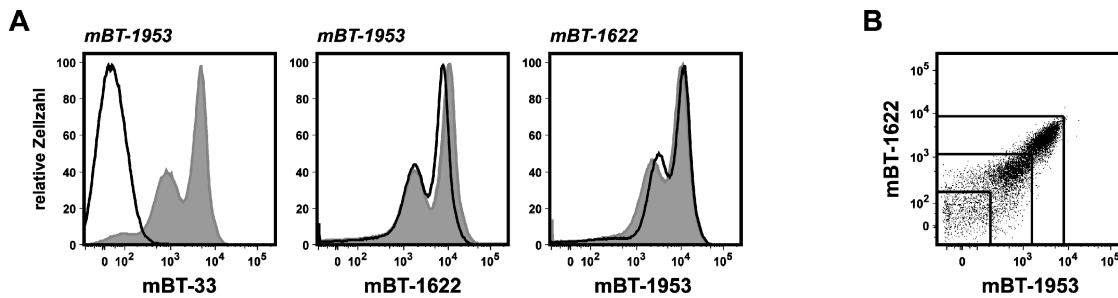
Durchflusszytometrische Analyse der anti-BTLA mAK Bindung an Splenocyten. A) Um die Spezifität der mAK mit primären Zellen zu verifizieren wurden sowohl Milzzellen aus wt als auch BTLA-defizienten Mäusen mit Digoxigenin-gekoppeltem anti-BTLA mAK und nachfolgend anti-Dig-A647 gefärbt. Dargestellt ist exemplarisch die Färbung mit mBT-1622, gleiche Ergebnisse wurden für alle anderen gereinigten mAK erhalten. B) Dissoziation der BTLA-spezifischen mAK bei 37 °C. Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen wurden mit den angegebenen anti-BTLA mAK gekoppelt an Digoxigenin für 30 min auf Eis inkubiert, gewaschen, danach bei 37 °C inkubiert und die verbliebene AK-Bindung mit anti-Dig-A647 detektiert. Dargestellt ist jeweils der Vergleich der detektierbaren mAK Bindung direkt nach Inkubation mit den mAK auf Eis (grau ausgefülltes Histogramm) und nach verschiedenen Zeitpunkten bei 37 °C (offene Histogramme).

Auf Grund der deutlichen geringeren Dissoziation des mAK aus der Ratte wurden die Affinitäten der mAK wie folgt eingeschätzt: mBT-1622 > mBT-1953 > andere Maus-mAK.

#### 3.1.4.2 Bindungsstellen der BTLA-spezifischen mAK

Um die Bindungsstellen der mAK genauer zu definieren, wurde die Bindung jedes anti-BTLA mAK in Anwesenheit jeweils eines anderen BTLA-spezifischen Antikörpers analysiert. Dabei wurden entweder beide Reagenzien gleichzeitig für die Färbung in der Durchflusszytometrie

verwendet oder der nicht gekoppelte Antikörper im Überschuss vor der Färbung mit dem gekoppelten Antikörper zugegeben. Wie in Abb. 9 dargestellt, bindet der anti-BTLA mAK aus der Ratte unabhängig von den Maus-mAK und umgekehrt, hingegen verhindern die Maus-mAK untereinander die Bindung an BTLA. Somit war auch die gleichzeitige Färbung von BTLA mit mBT-1622 und jeweils einem Maus-mAK möglich (Abb. 9 B).

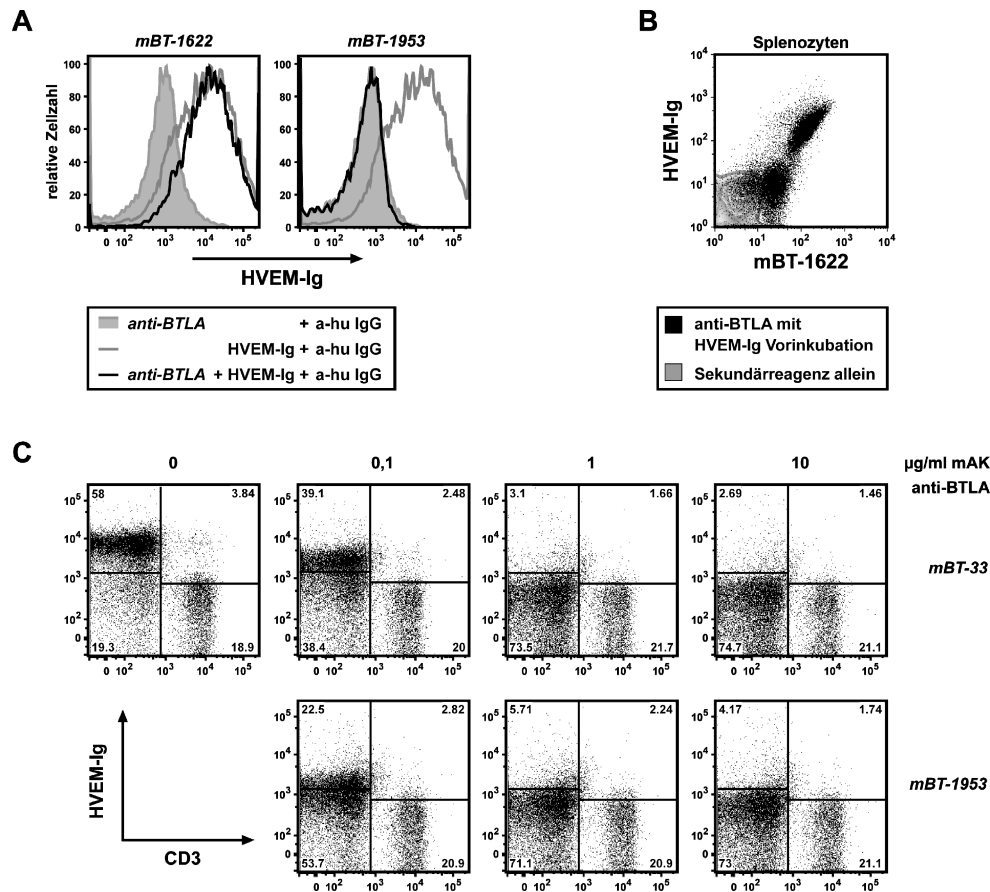


**Abb. 9: Vergleich der Bindungsstellen der verschiedenen anti-BTLA mAK untereinander**

Durchflusszytometrische Analyse der anti-BTLA mAK Bindung an Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen in Anwesenheit jeweils eines anderen BTLA-spezifischen mAK. Splenozyten wurden mit an Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten anti-BTLA mAK gefärbt, wobei die verwendeten mAK für die Färbung in der Achsenbeschriftung angegeben sind. Die Färbung erfolgte entweder bei gleichzeitiger Inkubation mit einem Überschuss an ungekoppelten zweiten mAK (schwarzes Histogramm = 150 µg/ml anti-BTLA mAK, angegeben in Kursiv oberhalb der Histogrammdarstellung; grau ausgefülltes Histogramm = Isotyp), oder wie in B) gleichzeitig mit zwei gekoppelten mAK. Durch die dargestellten Geraden sollen die unabhängigen Bindungen der beiden mAK voneinander verdeutlicht werden, sie zeigen die Begrenzung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten der Färbung der mAK 1622 PE und 1953-Dig ohne den jeweils anderen mAK.

Vergleicht man die Bindungsstellen der mAK mit der des BTLA-Liganden, so lässt sich feststellen, dass sowohl der anti-BTLA mAK mBT-1622 als auch das HVEM-Fusionsprotein gleichzeitig an BTLA binden können. Der Ratten mAK verhindert auch im Überschuss nicht die Bindung von HVEM-Ig, ist somit ein nicht blockierender mAK (Abb. 10 A und B). Auf Grund der Kreuzreaktivität des verwendeten anti-humanen Sekundärreagenzes mit mAK aus der Ratte (nicht gezeigt) wurde zur Beurteilung der Blockade das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment des mAK eingesetzt. Die Blockade der HVEM-Ig Bindung durch die anti-BTLA mAK aus der Maus, die schon bei der Selektion der Hybridomüberstände beobachtet wurde, konnte auch mit den gereinigten mAK sowohl auf Zelllinien als auch auf primären Zellen erzielt werden (Abb. 10 A und C). Die Färbung mit HVEM-Ig wurde dabei nicht nur verhindert, wenn die Antikörper bereits an BTLA gebunden waren. Die blockierenden anti-BTLA mAK waren ebenso in der Lage das HVEM-Ig zu verdrängen, aber nicht umgekehrt (nicht gezeigt). Eine Inhibition der HVEM-Ig Bindung konnte dabei auch noch mit mAK-Konzentrationen von etwa 1 µg/ml beobachtet werden.





**Abb. 10: Anti-BTLA mAK Bindungsstellen im Vergleich mit dem Liganden**

Durchflusszytometrische Analyse der Färbung von BTLA-exprimierenden Zellen mit HVEM-Fusionsprotein in Anwesenheit verschiedener BTLA-spezifischer mAK. A) L-Zellen transfiziert mit BTLA wurden mit 20 µg/ml ungekoppeltem anti-BTLA mAK inkubiert (mAK in Kursiv oberhalb der Histogrammdarstellung angeben) und anschließend mit HVEM-Ig entsprechend Abb. 5 gefärbt (schwarzes Histogramm). Die Färbung des Fusionsproteins ohne anti-BTLA mAK ist als offenes graues Histogramm dargestellt, die Hintergrundfärbung des Sekundärreagenzes in Anwesenheit des mAK als ausgefülltes graues Histogramm. Der mBT-1622 AK wurde wie im Text beschrieben als F(ab')<sub>2</sub>-Fragment eingesetzt. B) + C) Färbung von Milzzellen mit HVEM-Ig gleichzeitig mit mBT-1622-PE (B) oder in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der angegebenen ungekoppelten anti-BTLA mAK (C). Zur Beurteilung der Blockade der HVEM-Bindung durch die BTLA-spezifischen mAK ist in C) die HVEM-Ig Färbung ohne mAK ebenfalls dargestellt, sowie die gesetzten Quadranten entsprechend der Hintergrundfärbung des Sekundärreagenzes ohne HVEM-Ig.

Auch für alle anti-BTLA mAK aus der Maus wurden F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente generiert (Ergebnis nicht gezeigt), die sich jedoch bezüglich der Bindung an BTLA und Blockade der HVEM-Bindung nicht von den kompletten mAK unterschieden. Ein weiterer Hinweis auf die, verglichen mit HVEM-Ig, höhere Affinität der mAK zu BTLA ist zudem die Färbung der Splenozyten mit beiden Reagenzien. Während es mit HVEM-Ig nur möglich ist, die primären Zellen anzufärben, die viel BTLA exprimieren, können mit den Antikörpern ebenfalls schwächer BTLA exprimierende Zellen detektiert werden (Abb. 10 B)

Zusammenfassend erkennen alle gereinigten AK spezifisch BTLA. Sie können mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden und sind gut für die Anwendung in der Durchflusszytometrie geeignet. Der Ratten mAK und die mAK aus der Maus erkennen unterschiedliche Epitope des BTLA-Moleküls, wobei die Bindungsstellen der Maus-mAK in unmittelbarer Umgebung der Ligandenbindungsstelle lokalisiert sein müssen. Dabei sollte erwähnt werden, dass die generierten anti-BTLA Antikörper aus der Maus sehr spezifisch nur C57BL/6 BTLA erkennen und somit auch nur die HVEM-Bindung an Zellen dieses Mausstamms verhindern (nicht gezeigt). Diese Antikörper binden somit an Regionen von BTLA die zwischen den Mausstämmen verschieden sind. Laut Literatur (Compaan *et al.*, 2005) sind diese Regionen jedoch nicht an der BTLA-HVEM Bindung beteiligt. Aufgrund seiner hohen Affinität wurde für alle nachfolgenden BTLA Färbungen der mAK mBT-1622 verwendet. Er erkennt BTLA in allen Mausstämmen, unabhängig von gebundenem HVEM, und ist zudem als einziger mAK auch für Immunhistologie (Immunhistochemie, IHC) verwendbar. Wenn möglich, wurden die erhaltenen Ergebnisse jedoch mit anderen anti-BTLA mAK überprüft.

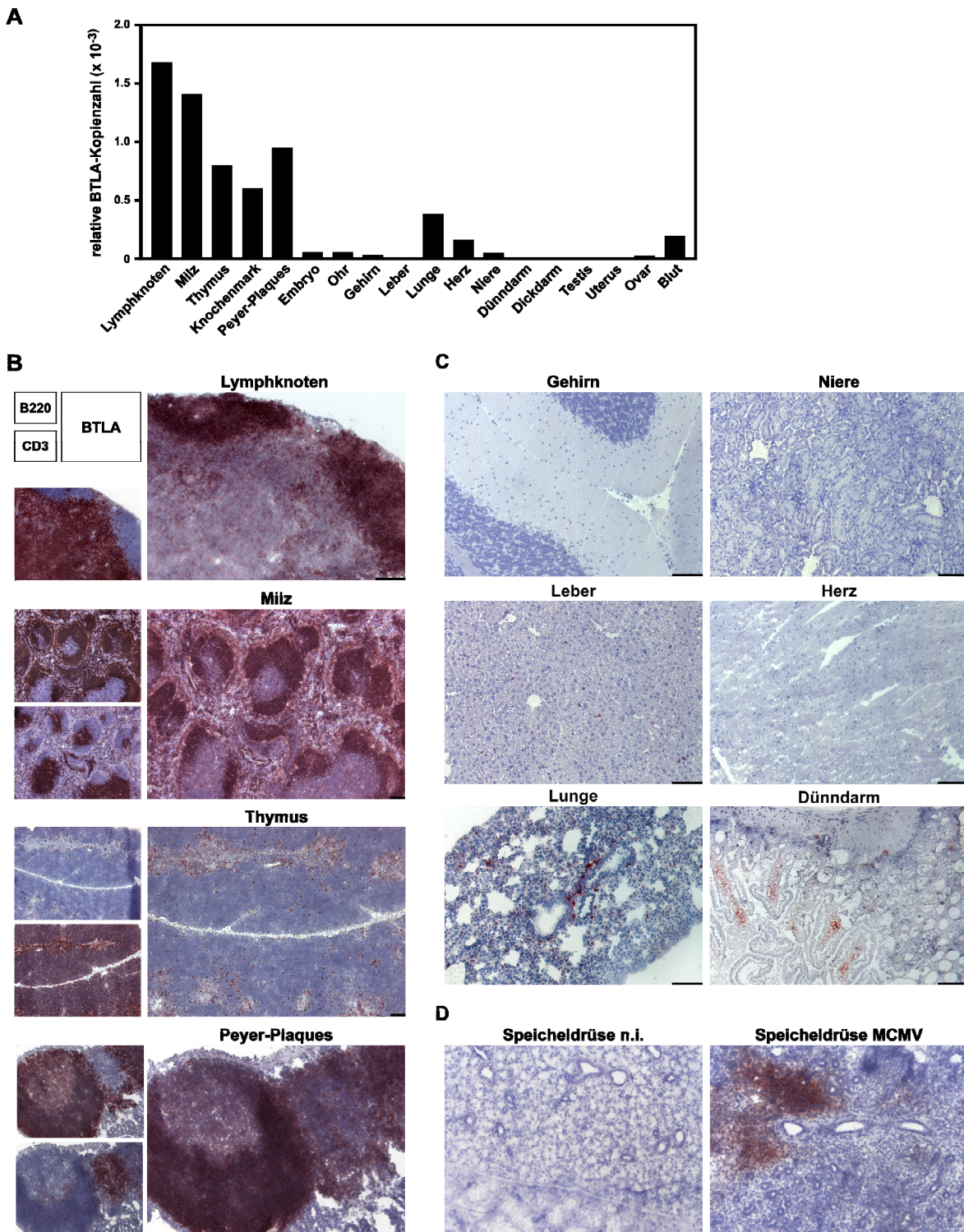
### **3.2 Analyse der BTLA-Expression**

Eine genaue Charakterisierung von BTLA hinsichtlich funktioneller Aspekte setzte die detaillierte Kenntnis der Expression und Regulation dieses Moleküls voraus. Expressionsdaten waren in der Literatur anfänglich jedoch nur für BTLA-mRNA vorhanden. Mit Hilfe der generierten AK war damit eine Untersuchung der Expression von BTLA auf Proteinebene erst durchführbar. In dieser Arbeit wurde umfassend die Expression von BTLA in unterschiedlichen Geweben der Maus immunhistologisch untersucht (Kapitel 3.2.1), sowie verschiedene Zellpopulationen diverser lymphatischer Organe analysiert (Kapitel 3.2.2 und 3.2.3), jeweils unterstützt von RNA-Daten der quantitativen RT-PCR. Darüber hinaus wurde mit einem ebenfalls in der Arbeitsgruppe KroczeK generierten mAK gegen murines HVEM auch die Expression des BTLA-Liganden untersucht.

#### **3.2.1 BTLA ist in lymphatischen Organen exprimiert**

Durch die Verwendung von spezifischem mAK war es nicht nur möglich, die Proteinexpression im Gewebe nachzuweisen, sondern auch die Lokalisation BTLA-exprimierender Zellen zu beschreiben. Da bisher keine publizierten immunhistologischen Expressionsdaten von BTLA existierten, soll nachfolgend auf wesentliche Befunde dieser

Analysen eingegangen werden. Kryoschnitte verschiedener Gewebe der Maus wurden mit anti-BTLA mAK gefärbt. Die Detektion erfolgte über die Umsetzung von AEC als Chromogen durch an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase. Auf Gewebeschnitten von BTLA-defizienten Mäusen konnten keine Signale mit dem anti-BTLA mAK detektiert werden (nicht gezeigt), womit die Spezifität des mAK auch für die IHC kontrolliert wurde. In Abb. 11 (B–D) ist eine Auswahl der mit BTLA-spezifischem mAK gefärbten Gewebe dargestellt. Übereinstimmend mit der mRNA Expression des Moleküls (Abb. 8 A) konnte BTLA auch auf Proteinebene fast ausschließlich in lymphatischen Organen detektiert werden. Es fiel eine deutliche BTLA-Färbung vor allem auf der Milz, Lymphknoten und auch den Peyer-Plaques auf. In der Milz war eine Färbung der weißen Pulpa zu erkennen, wobei sich eine schwächere Färbung in der T-Zellzone verglichen mit einer erheblich stärkeren Färbung in der B-Zellzone unterscheiden ließen. Auch in Lymphknoten ließen sich die Bereiche der B-Zellfollikel aufgrund ihrer starken BTLA-Färbung vom restlichen Gewebe abgrenzen, ebenso wie in den Peyer-Plaques. BTLA-Signale wurden im Thymus vorwiegend in der Medulla aber vereinzelt auch im Kortex detektiert. Dabei waren im gesamten Bereich der Medulla schwach positive Zellen zu finden, während stärkere Signale verstreut im gesamten Thymusgewebe auftraten. Betrachtet man hingegen alle nichtlymphatischen Organe (Abb. 11 C), sowohl histologisch als auch in der quantitativen RT-PCR, ist dort kaum BTLA-Expression vorhanden. Lediglich in Lunge und Lamina propria des Darms waren vereinzelt distinkte Färbungen zu erkennen. Da dort ebenfalls Lymphozytenfärbungen möglich waren (nicht gezeigt), ist eher eine Färbung auf diesen Zellen anzunehmen. Eine Korrelation der BTLA-Färbung mit dem Vorhandensein von Lymphozyten fiel auch bei der Analyse von inflammatorischen Geweben auf. Waren in den betreffenden Organen, wie MCMV infizierte Speicheldrüsen (Abb. 8 D) oder auch Lungen aus verschiedenen Inflamationsmodellen (nicht gezeigt) Lymphozyteninfiltrate zu finden, konnte in diesen Bereichen auch BTLA detektiert werden.



**Abb. 11: Detektion der BTLA-Expression in verschiedenen Geweben der Maus**

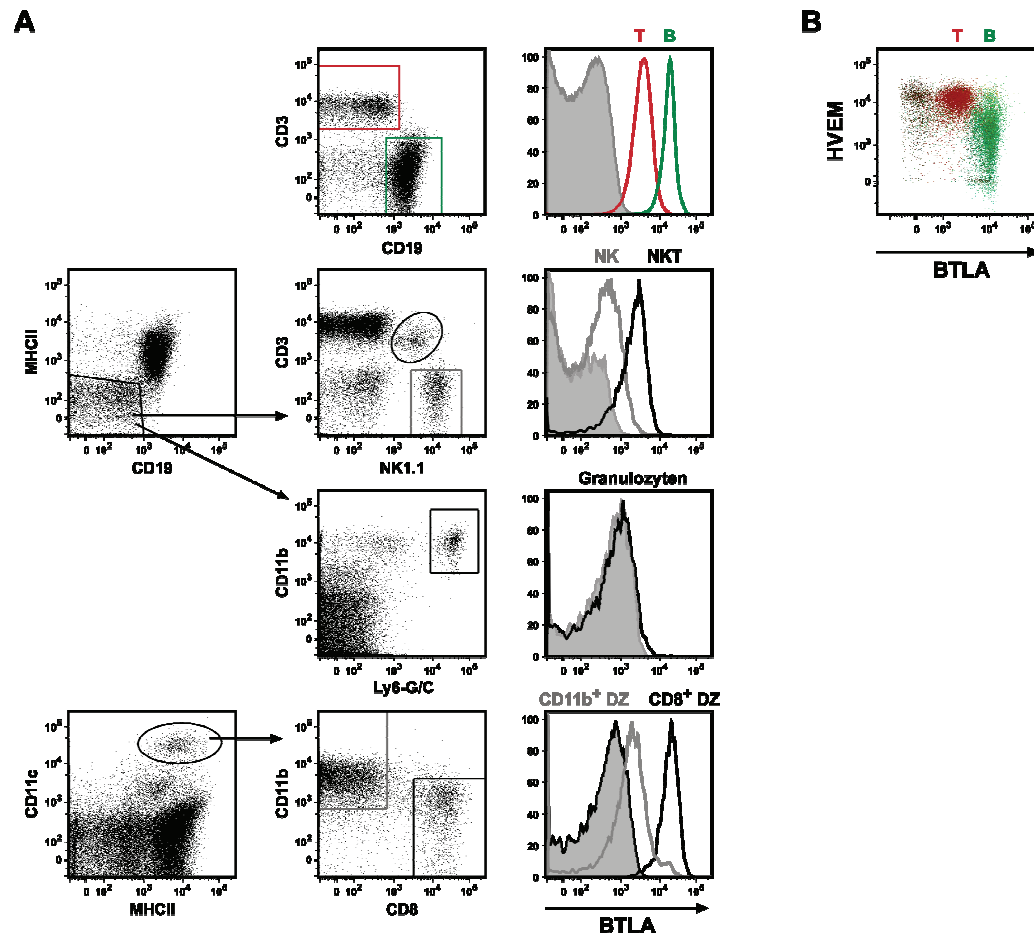
Analyse der BTLA-Expression in verschiedenen Organen naiver C57BL/6 Mäuse (A-C) oder nach Infektion (D). A) Nach Präparation der RNA aus den jeweiligen Organen wurde die relative Anzahl der BTLA-mRNA Kopien bezogen auf  $\beta_2$ -Microglobulin als Referenztranskript mit quantitativer RT-PCR bestimmt. (B-D) Nachweis der BTLA-Proteinexpression mit Immunhistochemie. Kryoschnitte der Gewebe wurden mit mBT-1622-Dig inkubiert, die Detektion erfolgte über Digoxigenin-spezifische POD und Verwendung von AEC als Chromogen. Kernfärbung durch Mayer's Hämalaun (blau), BTLA-positive Signale sind durch die rote Färbung zu erkennen. B) Zur Beurteilung der Lokalisation BTLA-tragender Zellen in den lymphatischen Organen wurden zusätzlich Serienschnitte mit anti-CD3/anti-B220 mAK gefärbt (FITC-gekoppelt, nachfolgend anti-FITC-POD; kleinere

Abbildungen links neben den BTLA-Färbungen). C) BTLA-Färbung von nicht lymphatischen Geweben naiver Mäuse. D) Speicheldrüse einer nicht infizierten (n. i.) Maus bzw. nach MCMV Infektion, gefärbt mit anti-BTLA mAK. Der Maßstabsbalken in den Aufnahmen entspricht jeweils 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2 BTLA ist konstitutiv auf Zellen des Immunsystems exprimiert

Um die BTLA-tragenden Zellpopulationen exakt zu bestimmen, wurden die Organe, in denen BTLA-Expression nachgewiesen werden konnte, nachfolgend auf Einzelzellebene untersucht. Zur Definition der unterschiedlichen Zellpopulationen in den lymphatischen Organen wurden hierbei linienspezifische Marker zusammen mit anderen charakteristischen Oberflächenmarkern verwendet, die eine weitere Auftrennung in Subtypen erlaubten. Die Proteinexpression auf der Zelloberfläche einzelner Zellen wurde *ex vivo* mittels Mehrfarbenanalyse in der Durchflusszytometrie innerhalb der komplexen Zellsuspension vollständiger Organe untersucht. Betrachtet man eine einfache Färbung von Gesamtsplenozyten mit den in dieser Arbeit generierten BTLA-spezifischen mAK, fallen zunächst zwei Peaks der BTLA-Expression auf (Abb. 8). Durch gleichzeitige Färbung der Zellen mit linienspezifischen Antikörpern konnten diese beiden Expressionsstärken definierten Zellpopulationen zugeordnet werden (Abb. 12). Wie schon bei der immunhistologischen Betrachtung von Milzgewebeschnitten angedeutet, war die höhere BTLA-Expression vor allem auf  $\text{CD19}^+$  B-Zellen zu finden, während sich die etwa 10-fach schwächere BTLA-Färbung hauptsächlich auf  $\text{CD3}^+$  T-Zellen zurückführen ließ. Doch auch andere Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimierten BTLA. So ist zwar in der Literatur die BTLA-Expression für einen Teil der NK-Zellen beschrieben (Sedy *et al.*, 2005), aber hier konnte gezeigt werden, dass es sich bei den BTLA-positiven  $\text{NK1.1}^+$  Zellen eigentlich um ebenfalls  $\text{CD3}^+$  NKT-Zellen handelte. Deren BTLA-Expression entspricht in etwa der von T-Zellen. Durch Vergleich mit Färbungen auf Splenozyten aus BTLA-defizienten Mäusen war allerdings auch eine deutlich schwächere BTLA-Expression auf NK-Zellen ( $\text{NK1.1}^+ \text{CD3}^-$ ) erkennbar, die jedoch mit den publizierten AK nicht detektierbar war. Neben den B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen exprimierten auch  $\text{CD11c}^+$  Dendritische Zellen (DZ) BTLA. Die Subtypen der DZ wiederum unterschieden sich deutlich in ihrer BTLA-Expression. Auf der Zelloberfläche von  $\text{CD8}^+$  DZ und auch plasmazytoiden DZ (PDZ, nicht gezeigt) konnte viel BTLA detektiert werden, die Intensität der BTLA-Färbung war hier vergleichbar mit der von B-Zellen. Hingegen exprimierten die  $\text{CD11b}^+$  DZ deutlich weniger BTLA. Auf Granulozyten konnte kein BTLA detektiert werden. Alle BTLA-exprimierenden Splenozyten ließen sich somit in zwei Gruppen einordnen. Auf der einen Seite exprimieren alle T-Zellen inklusive der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und regulatorischen

T-Zellen (nicht gezeigt), sowie NKT-Zellen und  $CD11b^+$  DZ, zwar deutliche aber dennoch relativ geringe Mengen an BTLA, andererseits ließ sich etwa 10-fach mehr BTLA auf der Zelloberfläche von B-Zellen, PDZ und  $CD8^+$  DZ detektieren.



**Abb. 12: Analyse der BTLA-Expression auf verschiedenen Zellpopulationen der Milz**

Durchflusszytometrische Analyse der Färbung von Splenozyten mit dem BTLA-spezifischen mAK mBT-1622. A) Die Expression von BTLA auf verschiedenen Zellpopulationen ist in der Histogrammdarstellung gezeigt, wobei die Definition der Zellpopulationen in den entsprechenden Farben jeweils links daneben abgebildet ist. Die grau ausgefüllten Histogramme zeigen die Hintergrundfärbung mit einem Isotyp-Kontrollantikörper, für T- und B-Zellen auf Gesamtsplenozyten, für die NK- und NKT-Färbung auf allen  $NK1.1^+$ -Zellen, und für die DZ-Subpopulationsfärbung auf der gesamten  $CD11c^+$   $MHCII^+$ -Population. B) BTLA-Expression im Vergleich zur Expression von HVEM. Splenozyten wurden zusätzlich zur BTLA-Färbung mit mHV-1411 mAK zur Detektion der HVEM-Expression gefärbt. Die T- und B-Zellpopulation ist entsprechend der Definition in A) in unterschiedlichen Farben dargestellt. Gleiche Ergebnisse wurden für Lymphknotenzellen erhalten.

Zelltypen mit einer BTLA-Expression zwischen diesen beiden Zuständen waren zumindest im unbehandelten Tier nicht zu finden. Die hier beschriebene BTLA-Expression konnte für die entsprechenden Zellpopulationen auch in anderen sekundärlymphatischen Organen, wie Lymphknoten und den Peyer-Plaques aber auch im peripheren Blut beobachtet werden (nicht gezeigt). Auf allen Zellen, die BTLA exprimierten, konnte interessanterweise auch HVEM-

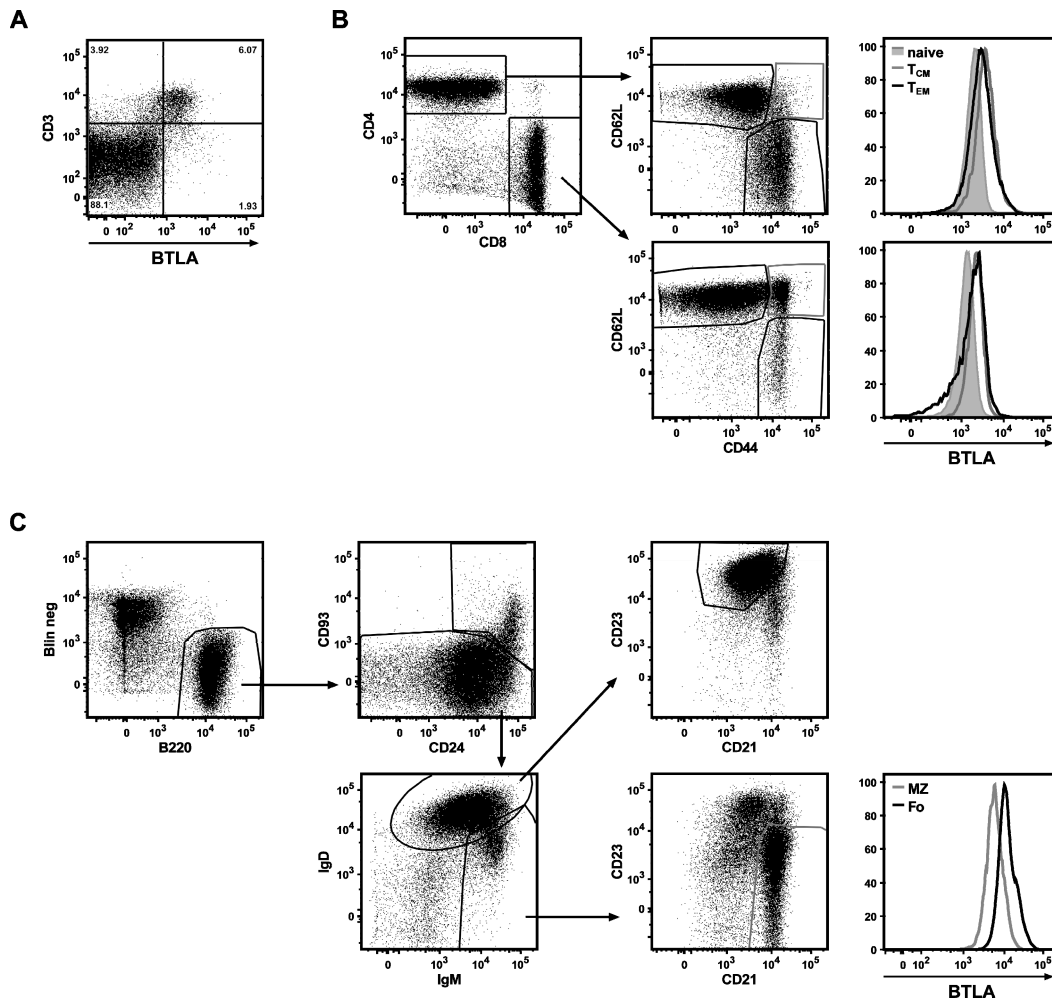


Expression nachgewiesen werden. NK-Zellen, die kaum detektierbare Mengen BTLA exprimierten, besaßen auch nur wenig HVEM auf ihrer Oberfläche, CD8<sup>+</sup> DZ dagegen exprimierten sowohl viel BTLA als auch viel HVEM (nicht gezeigt, (DeTrez *et al.*, 2008)). Die Expressionen von Rezeptor und Ligand auf den beiden Hauptlymphozytenpopulationen jedoch verhielten sich jeweils reziprok. Während B-Zellen viel BTLA exprimierten, waren auf diesen nur relativ geringe Mengen HVEM vorhanden. Hingegen exprimierten T-Zellen zwar weniger BTLA, dafür aber viel HVEM (Abb. 12 B). Alle analysierten CD45-negativen Zellen, wie Erythrozyten oder Epithelzellen aus Lunge und Darm exprimierten kein BTLA, jedoch ebenso wie Granulozyten substantielle Mengen an HVEM (nicht gezeigt). Die auffallend verbreitete und starke konstitutive Expression von sowohl Rezeptor als auch Ligand auf an der Immunantwort beteiligten Zellpopulationen, ist sicherlich ein wichtiger Aspekt bei der Beurteilung der funktionellen Rolle dieses Molekülpaars für immunologische Prozesse. Die Ursache für die unterschiedlichen Expressionsniveaus beider Moleküle und auch deren Relevanz für die Funktion der verschiedenen Zelltypen ist bisher nicht bekannt.

### **3.2.3 Die BTLA-Expression ändert sich während der Lymphozytendifferenzierung**

Betrachtet man die BTLA-Expression auf Lymphozyten im Verlauf ihrer Entwicklung in den primären lymphatischen Organen, so korreliert diese mit dem Reifungsgrad der Zellen. Wie schon von Han *et al.* (Han *et al.*, 2004) beschrieben, setzt die BTLA-Expression auf T-Lymphozyten im Thymus erst in der späteren Phase etwa beim Übergang von doppelt-positivem Stadium zu den einfach-positiven T-Zellen ein. Es konnte eine positive Korrelation mit der CD3-Expression an der Zelloberfläche reifer T-Zellen beobachtet werden (Abb. 13 A). Dieser Befund deckt sich ebenso mit der histologisch beschriebenen Lokalisation schwach BTLA-positiver Zellen in der Medulla (Kap. 3.2.1, Abb. 11), dem Bereich, von dem aus reife T-Zellen nach erfolgter Selektion den Thymus verlassen. Auch B-Lymphozyten exprimieren erst nach vollständigem Reifungsprozess im Knochenmark die für B-Zellen in der Peripherie beschriebenen BTLA-Mengen. Von den Pro- und Prä-B-Zellen über die unreifen B-Zellen nimmt die BTLA-Expression zu, bis sie auf den reifen B-Zellen ihren endgültigen Wert erreicht hat (nicht gezeigt, (Han *et al.*, 2004)). Auch während der späteren Lymphozytendifferenzierung in der Peripherie wurde die Expression von BTLA moduliert. So ließ sich auf T-Gedächtniszellen, sowohl der CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen, ein erhöhtes BTLA-Niveau gegenüber naiven T-Zellen feststellen (Abb. 13 B). Zudem exprimierten auch follikuläre B-Zellen etwa 2-fach mehr BTLA verglichen mit Marginalzonen-B-Zellen (Abb. 13 C). Die

Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen differenzierten Zellen innerhalb einer Lymphozytenpopulation waren zwar signifikant aber verglichen mit dem Expressionsunterschied zwischen T- und B-Zellen eher gering.



**Abb. 13: Expression von BTLA in Abhängigkeit von der Lymphozytendifferenzierung**

Durchflusszytometrische Analyse der Färbung von T-Lymphozyten während verschiedener Differenzierungsstadien (A+B) und unterschiedlichen B-Zellsubpopulationen (C) mit dem BTLA-spezifischen mAK mBT-1622. A) Thymozyten wurden mit anti-CD3 und anti-BTLA mAK gefärbt. Dargestellt ist die Korrelation der beiden Färbungen. (B+C). Die Expression von BTLA auf T- und B-Zellsubpopulationen in der Milz ist in der Histogrammdarstellung gezeigt, wobei die Definition der entsprechenden Zellpopulationen jeweils links daneben abgebildet ist. B) Ausgehend von der CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>MHCII<sup>-</sup> Zellpopulation wurden sowohl die CD4<sup>+</sup> als auch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen anhand der Oberflächenantigene CD62L und CD44 in naive (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>), *Central-Memory* T-Zellen (T<sub>CM</sub>, CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) und *Effector-Memory* T-Zellen (T<sub>EM</sub>, CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) unterteilt und deren BTLA-Expression analysiert. Gleiche Ergebnisse wurden für Lymphknotenzellen erhalten. C) Reife B-Zellen (B220<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>Ly-6G/C<sup>-</sup>CD93<sup>-</sup>) wurden in Follikuläre B-Zellen (Fo, IgD<sup>high</sup>IgM<sup>high</sup>CD21<sup>int</sup>CD23<sup>+</sup>) und Marginalzonen-B-Zellen (MZ, IgD<sup>low</sup>IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup>CD23<sup>-</sup>) unterteilt und deren BTLA-Expression analysiert.

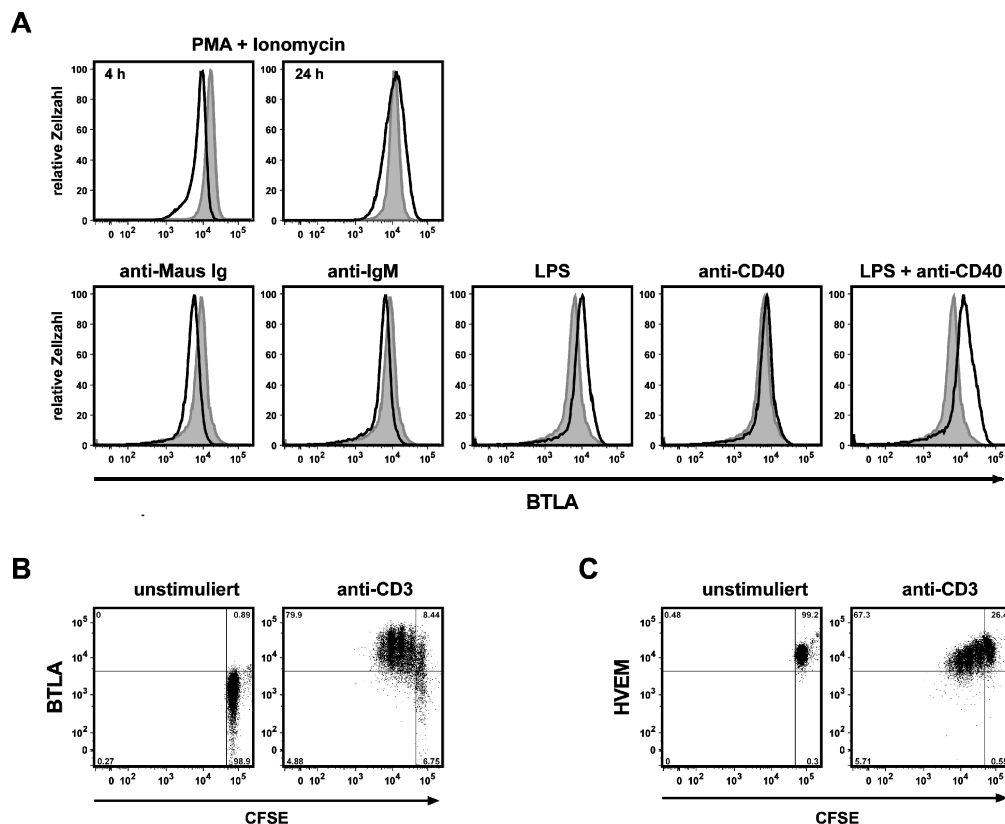


### 3.2.4 Nach Lymphozytenaktivierung wird die BTLA-Expression differenziell reguliert

Obwohl BTLA bereits konstitutiv auf den verschiedenen Lymphozytenpopulationen exprimiert wurde, konnte zudem eine aktivierungsabhängige Regulation der BTLA-Oberflächendichte auf den Zellen beobachtet werden.

#### 3.2.4.1 BTLA-Expression nach B-Zellaktivierung

Auf B-Zellen wurden nach Aktivierung je nach Art der Stimulation unterschiedliche Veränderung der BTLA-Expression festgestellt (Abb. 14 A).



**Abb. 14: Expression von BTLA nach Lymphozytenaktivierung**

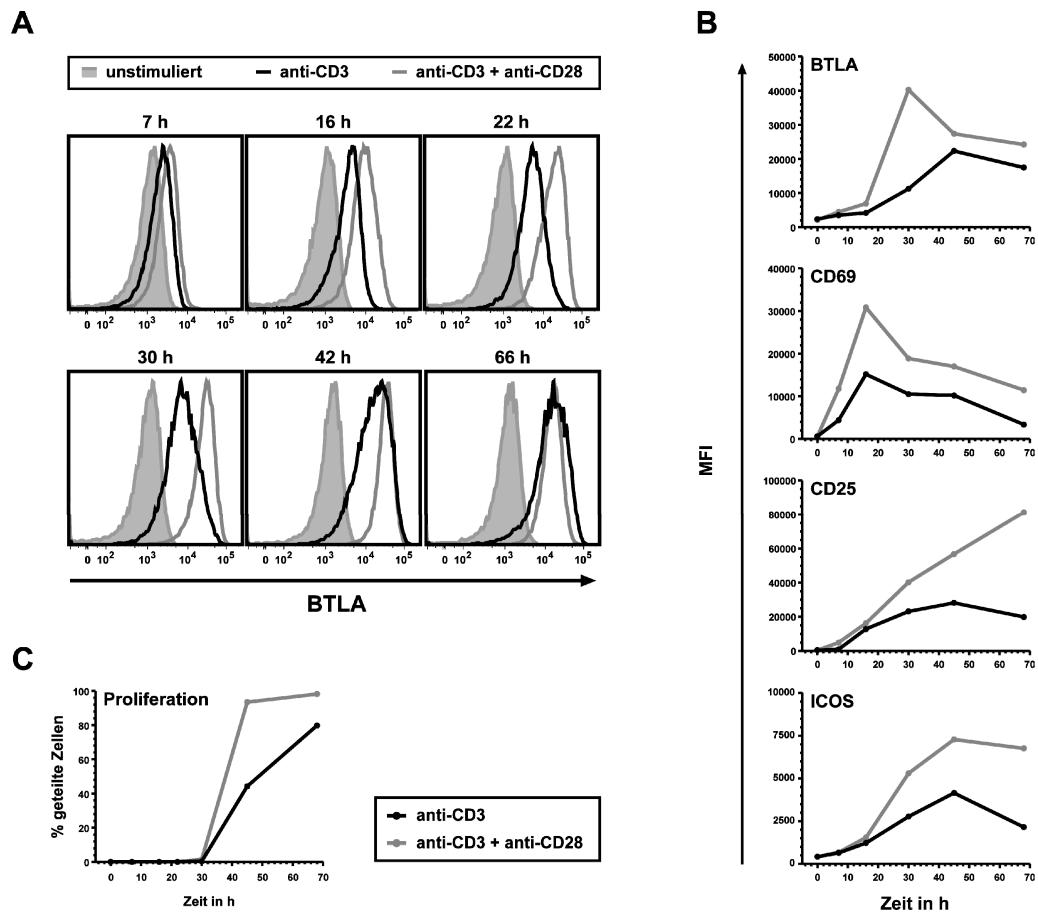
Durchflusszytometrische Analyse von *in vitro* aktivierten B-Zellen (A) und T-Zellen (B/C). A) Sortierte B-Zellen aus der Milz ( $CD90^-CD11c^-NK1.1^-Ly-6G/C^-$ ) wurden mit den angegebenen Reagenzien stimuliert, und die BTLA-Expression auf den  $CD19^+MHCII^+$  Zellen nach Aktivierung untersucht (schwarzes Histogramm). Die BTLA-Expression auf unstimulierten Zellen ist jeweils als grau ausgefülltes Histogramm abgebildet. Obere Reihe: Stimulation mit PMA und Ionomycin, Analyse nach den angegebenen Zeitpunkten. Untere Reihe: Analyse nach 18 h Stimulation. B/C) Sortierte T-Zellen aus der Milz ( $B220^-CD11b^-D11c^-NK1.1^-$ ) wurden mit CFSE markiert und für 60 h mit  $0,25 \mu\text{g/ml}$  plattengebundenem anti-CD3 mAK stimuliert. B) Dargestellt ist die BTLA-Expression auf stimulierten verglichen mit unstimulierten T-Zellen in Verbindung mit dem CFSE-Fluoreszenzsignal, wodurch sich ungeteilte ( $CFSE^{\text{high}}$ ) von geteilten Zellen (Abnahme des CFSE-Signals mit jeder Zellteilung) unterscheiden lassen. C) HVEM-Expression auf den gleichen Zellen wie in B). Dargestellt ist jeweils 1 repräsentatives Ergebnis von A) 3, und B/C) mehr als 5 Experimenten.

Wurden B-Zellen *in vitro* mit PMA und Ionomycin stimuliert, so war bereits nach 4 h eine deutliche Herunterregulation von BTLA messbar, später wurde aber wieder das ursprüngliche Expressionsniveau erreicht. Während die Aktivierung über den B-Zellrezeptor mittels polyklonalem anti-Ig AK ebenfalls eine Reduktion der BTLA-Expression zur Folge hatte, war nach 18 h Stimulation von B-Zellen mit LPS die BTLA-Expression angestiegen. Durch anti-CD40 mAK wurde der LPS-vermittelte Effekt zudem deutlich verstärkt. Diese *in vitro* Daten könnten auf eine unterschiedliche Beteiligung von BTLA bei verschiedenen Prozessen der B-Zellaktivierung hinweisen.

#### 3.2.4.2 BTLA-Expression nach T-Zellaktivierung

Auf T-Zellseite wurde durch Aktivierung, unabhängig vom Stimulus, eine deutlich verstärkte BTLA-Expression induziert. Die T-Zellen wurden hierfür *in vitro* antigenunabhängig mit PMA und Ionomycin stimuliert (nicht gezeigt), oder aber durch Quervernetzung des TZR mittels immobilisiertem anti-CD3 mAK (Abb. 14 B, C). Zudem wurden auch T-Zellen aus TZR-transgenen OT-I und OT-II Mäusen nach *in vitro* Stimulation mit Ovalbuminpeptid analysiert (nicht gezeigt). Dabei konnte bei maximaler Stimulation der T-Zellen durchaus eine BTLA-Expression erreicht werden, die mit der starken Expression von BTLA auf B-Zellen vergleichbar war. Wie im Ruhezustand konnte auch nach Aktivierung der T-Zellen eine inverse Expression von BTLA und HVEM festgestellt werden. Während die T-Zellsimulation eine Hochregulation von BTLA bewirkte, kam es im Verlauf der Aktivierung zu Herunterregulation des Liganden HVEM von der Zelloberfläche (Abb. 14 C). Somit exprimieren ruhende T-Zellen geringe Mengen BTLA jedoch viel HVEM, aktivierte T-Zellen hingegen zwar viel BTLA aber nur wenig HVEM. Zur genaueren Analyse der Regulation von BTLA auf der Zelloberfläche von aktivierten T-Zellen wurde die Expression von BTLA zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf einer *in vitro* T-Zellstimulation bestimmt, und dabei ebenso mit anderen Oberflächenaktivierungsantigenen verglichen. Sowohl die Stimulation von sortierten T-Zellsubpopulationen als auch die Analyse dieser in einer Kultur aus Gesamt-T-Zellen führte dabei zu vergleichbaren Ergebnissen. Da in der Expressionskinetik von BTLA zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine zeitlichen Unterschiede festgestellt wurden, ist in Abb. 15 exemplarisch nur die Aktivierungskinetik von gereinigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit anti-CD3 mAK dargestellt. Bereits nach 6–12 h Stimulation konnte ein Anstieg der BTLA-Expression auf den T-Zellen detektiert werden. Verglichen mit dem frühen Aktivierungsantigen CD69 war die maximale Expression von BTLA jedoch erst später

zwischen 30 und 48 h festzustellen, etwa um den Zeitpunkt herum, als die Proliferation der aktivierten T-Zellen einsetzte (Abb. 15 C).

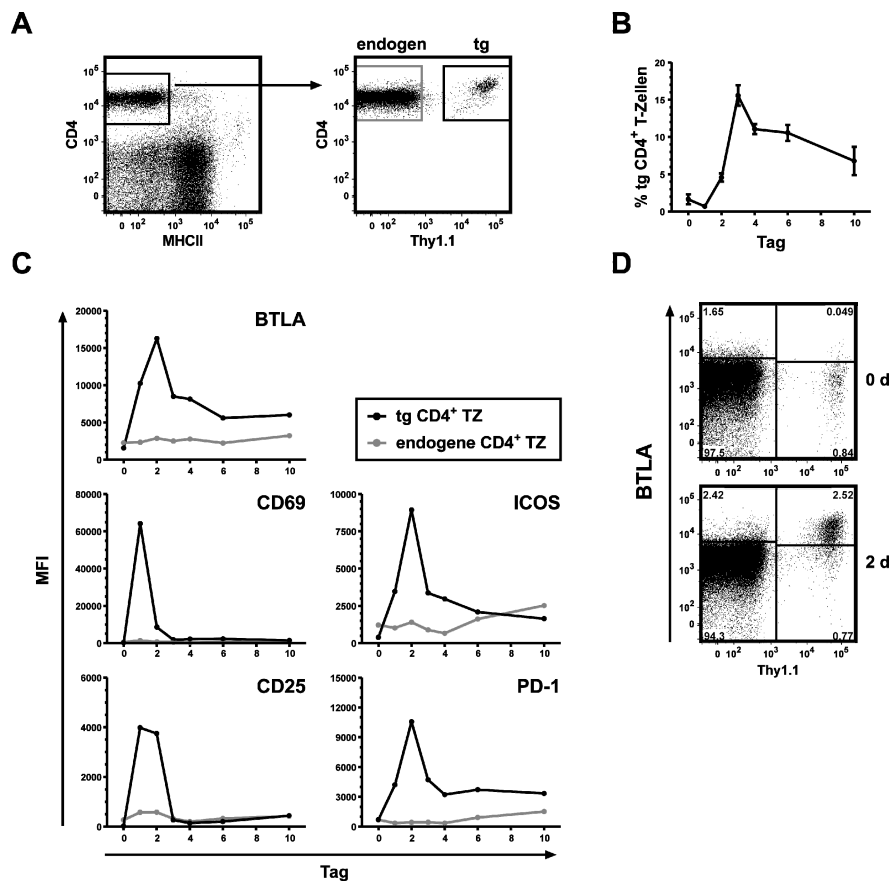


**Abb. 15: Kinetik der BTLA-Expression auf *in vitro* aktivierten T-Zellen**

Naive  $CD4^+$  T-Zellen wurden mit CFSE markiert, in Mikrotiterplatten mit 0,25  $\mu\text{g/ml}$  immobilisiertem anti-CD3 mAK in Anwesenheit von anti-CD28 mAK (graue Graphen) oder eines Isotyp-mAK (schwarze Graphen) stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert. A) Repräsentative Färbungen mit dem BTLA-spezifischen mAK mBT-1622 zu den angegebenen Zeitpunkten der Stimulation. B) Expressionskinetik von BTLA im Vergleich zu anderen aktivierungsinduzierten T-Zellantigenen und zur Zellproliferation (C). Angegeben sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Färbungen mit den entsprechenden mAK bzw. der berechnete Anteil an geteilten Zellen. Dargestellt ist 1 von 3 unabhängigen Experimenten. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit sortierten  $CD8^+$  T-Zellen erhalten.

Eine Hochregulation der BTLA-Expression war allein durch TZR Stimulation induzierbar, wurde aber durch Kostimulation über CD28 weiter verstärkt. Auch nach T-Zellaktivierung *in vivo* konnte eine vergleichbare Regulation der BTLA-Expression beobachtet werden. Dazu wurden Splenozyten aus OT-I (nicht gezeigt) oder OT-II Mäusen in syngene Rezipienten transferiert. Die  $CD8^+$  bzw.  $CD4^+$  T-Zellen aus diesen transgenen Mäusen besitzen einen TZR, der jeweils spezifisch eine bestimmte Peptidsequenz von Ovalbumin erkennt. Durch Immunisierung mit diesem Protein als Antigen konnten so die transferierten T-Zellen antigen-

spezifisch in physiologischer Umgebung aktiviert und die dadurch ausgelösten Expressionsveränderungen unterschiedlicher Oberflächenantigene analysiert werden. Wie in Abb. 16 gezeigt, ließ sich dabei ausschließlich auf antigenspezifischen T-Zellen, die sich durch den Marker Thy-1.1 identifizieren ließen, eine Regulation der BTLA-Oberflächenexpression feststellen. Die BTLA-Expressionskinetik verlief ähnlich zu der von PD-1 oder auch ICOS, mit einem Expressionsmaximum von BTLA etwa 48 h nach Immunisierung.



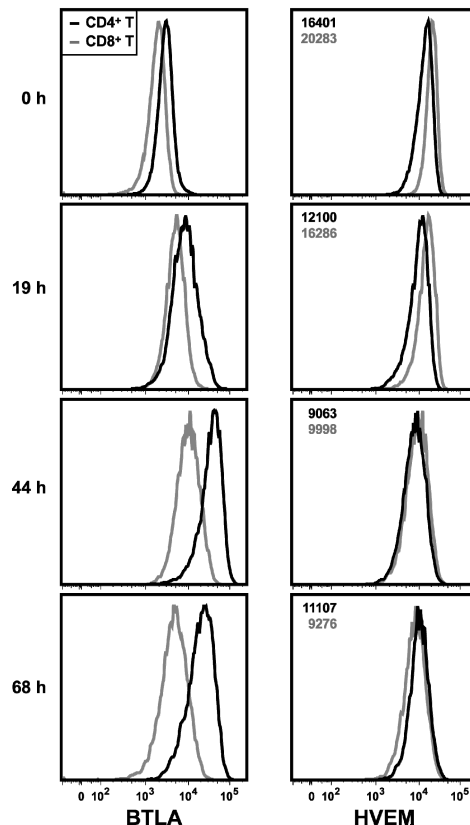
**Abb. 16: Kinetik der BTLA-Expression nach antigenspezifischer Aktivierung von T-Zellen *in vivo***

Adoptiver Transfer von  $2,5 \times 10^6$  TZR-transgenen T-Zellen (tg) aus Milzen von OT-II Mäusen in syngene C57BL/6 Mäuse. Nach 24 h wurden die Rezipientenmäuse s.c. mit 50 µg Alum-präzipitiertem Ovalbumin und  $5 \times 10^7$  hitzeinaktivierten *B. pertussis* als Adjuvans immunisiert (Tag 0) und die Zellen der drainierenden poplitealen Lymphknoten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung durchflusszytometrisch analysiert. A) Repräsentative Färbung zur Detektion antigenspezifischer T-Zellen innerhalb der gesamten Lymphknoten-zellen. Anhand des Thy-1.1 Markers lassen sich transferierte von den endogenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterscheiden. B) Expansion der transferierten tg T-Zellen nach Aktivierung durch das Antigen. Dargestellt ist der Anteil der tg CD4<sup>+</sup> T-Zellen an allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Lymphknotens zu den angegebenen Zeitpunkten nach Immunisierung. C) Expressionskinetik von BTLA im Vergleich zu anderen aktivierungsinduzierten TZ-Antigenen auf den antigenspezifischen T-Zellen (schwarze Kurven). Die Expression der Aktivierungsmarker auf den endogenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist als graue Kurve ebenfalls dargestellt, angegeben sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der entsprechenden mAK-Färbungen D) Repräsentative Färbungen mit dem BTLA-spezifischen mAK mBT-1622 vor und 2 Tage nach Immunisierung. Dargestellt sind alle CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wobei eine verstärkte BTLA-Expression ausschließlich auf den transferierten antigenspezifischen T-Zellen nach Immunisierung zu erkennen war.

In allen analysierten Systemen war eine positive Korrelation der BTLA-Expression mit der Stärke der T-Zellaktivierung zu beobachten. Bei noch suboptimaler Stimulation führte sowohl eine Verstärkung des TZR-Stimulus (durch verschiedene Mengen anti-CD3 mAK oder spezifisches Antigen) als auch Kostimulation (z.B. über anti-CD28 oder auch die Verwendung unterschiedlichster Adjuvanzen) zu mehr BTLA-Expression auf der T-Zelloberfläche. Durch zusätzliche Kostimulation konnte ebenfalls eine stärkere Herunterregulation von HVEM auf den T-Zellen erreicht werden (Vgl. Abb. 22). Die beobachtete Regulation der Oberflächenexpression von BTLA deutet auf unterschiedliche Erfordernisse für von BTLA vermittelte Signale während verschiedener Phasen der T-Zellaktivierung hin.

#### *3.2.4.3 CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren mehr BTLA als CD8<sup>+</sup> T-Zellen – auch nach Aktivierung*

Bei den Expressionsanalysen von BTLA und HVEM fiel weiterhin ein signifikanter Unterschied zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten auf, wobei sich die Expression beider Partnermoleküle auf den entsprechenden T-Zellpopulationen erneut entgegengesetzt verhielt. Auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde eine höhere BTLA, aber geringere HVEM-Expression als auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert (Abb. 17, 0 h). Diese Unterschiede waren auch beim Vergleich der jeweils naiven (CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup>) TZ-Populationen vorhanden und konnten auf reifen T-Zellen aller analysierten lymphatischen Organe festgestellt werden (nicht gezeigt). Wie bereits in Kapitel 3.2.4.2 beschrieben, führte sowohl die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einer Zunahme der BTLA-Expression auf der Zelloberfläche. Trotz der gleichen Expressionskinetik von BTLA auf beiden T-Zellsubpopulationen wurde zu allen Aktivierungszeitpunkten eine höhere BTLA-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen, verglichen mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen, beobachtet (Abb. 17). Für alle getesteten Stimulationsbedingungen, auch nach antigenspezifischer Aktivierung der T-Zellen *in vivo* (Kap 3.2.4.2), war auch das nach Aktivierung maximal erreichte BTLA-Niveau stets höher auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die funktionelle Relevanz dieses Expressionsunterschiedes zwischen den beiden T-Zellsubpopulationen soll in Kapitel 3.4.2 näher betrachtet werden.



**Abb. 17: BTLA und HVEM-Expression auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach T-Zellaktivierung**

Sortierte T-Zellen aus der Milz (B220<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>D11c<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>) wurden in Mikrotiterplatten mit 1 µg/ml immobilisiertem anti-CD3 mAK stimuliert und die Oberflächenexpression von BTLA und HVEM zu verschiedenen Zeitpunkten der Stimulation durchflusszytometrisch untersucht. Zum Vergleich der Expressionen auf den T-Zellsubpopulationen sind die Histogramme der Färbung mit mBT-1622 oder mHV-1411 mAK auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen (schwarz) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (grau) jeweils übereinandergelegt dargestellt. In den Diagrammen der HVEM-Färbungen sind die Werte der mittleren Fluoreszenzintensität des HVEM-Signals für die entsprechende Subpopulation mit angegeben. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mehr als fünf unabhängigen Experimenten.

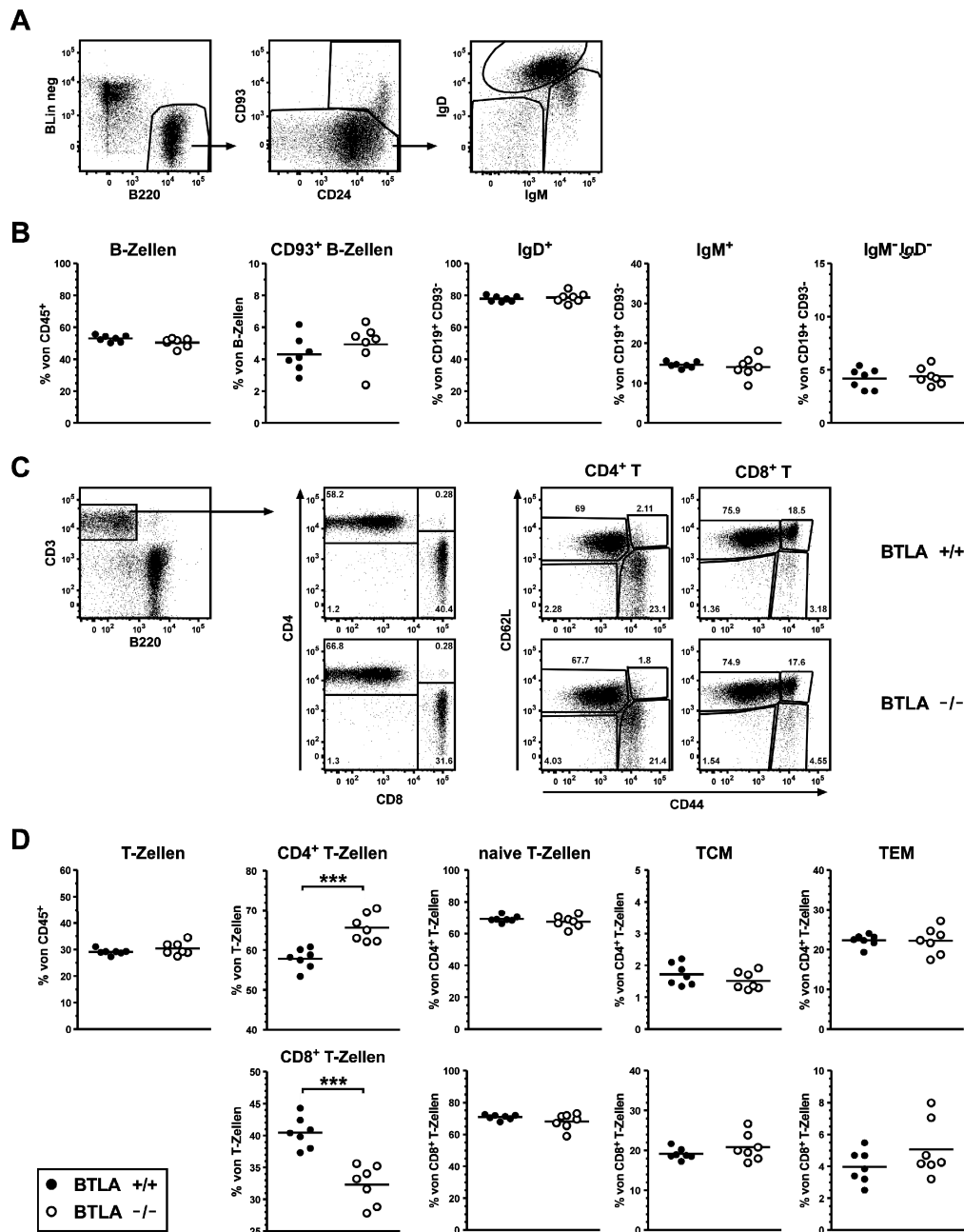
### 3.3 Analyse lymphatischer Zellpopulationen von Mäusen mit genetisch verändertem BTLA-Niveau

Da bereits im Ruhezustand eine starke konstitutive Expression von Rezeptor und Ligand auf beinahe allen Zellpopulationen in den lymphatischen Organen nachgewiesen werden konnte, ergab sich auch die Frage, ob dies bereits von funktioneller Bedeutung für verschiedene Prozesse wie Zelldifferenzierung und Aktivierung ist. Durch Analyse der Zellzusammensetzung in den lymphatischen Organen von transgenen Mäusen wurden die Auswirkungen von Veränderungen des BTLA-HVEM Systems untersucht. In dieser Arbeit wurden dafür BTLA transgene Mäuse, bei denen BTLA auf T-Zellen überexprimiert wird (BTLA<sup>tg</sup>), sowie BTLA- als auch HVEM-defiziente Mäuse (BTLA<sup>-/-</sup>, HVEM<sup>-/-</sup>) verwendet.

Alle Mäuse waren fertil und gesund, und zeigten keine offenkundigen morphologischen Auffälligkeiten.

### **3.3.1 Veränderungen im BTLA-HVEM System wirken sich bereits im Ruhezustand auf Zellpopulationen der lymphatischen Organe aus**

Die Analyse der defizienten Mäuse im Alter von 8–12 Wochen ergab normale Zellzahlen in den lymphatischen Organen, wie Milz und LN (Daten nicht gezeigt). In diesen Organen waren auch die T- und B-Zellfrequenzen mit denen von Wildtypmäusen (wt) vergleichbar (Abb. 18). Während die B-Zelldifferenzierung in BTLA-defizienten Tieren unverändert scheint (Abb. 18 B), war innerhalb der BTLA-defizienten T-Zellpopulation ein erhöhter prozentualer Anteil von CD4<sup>+</sup> und geringerer Anteil CD8<sup>+</sup> TZ verglichen mit den T-Zellpopulationen von WT-Tieren festzustellen (Abb. 18 C, D). Dieser Effekt trat auch in den Mäusen auf, in denen der BTLA-Ligand HVEM fehlt (nicht gezeigt). In der Literatur wurde als Ursache dafür eine Rolle von BTLA für die T-Zellhomöostase diskutiert (Krieg *et al.*, 2007). Eine Störung bei der Bildung von T-Gedächtniszellen in Abwesenheit von BTLA konnte bei jungen Mäusen nicht beobachtet werden (Abb. 18 C, D). Sowohl innerhalb der CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen waren normale Anteile von naiven und Gedächtniszellpopulationen festzustellen. Aufgrund der Verschiebung des CD4/CD8 Verhältnisses in diesen Tieren waren allerdings die absoluten Zellzahlen aller CD8<sup>+</sup> TZSubpopulationen reduziert, hingegen die aller CD4<sup>+</sup> TZ-Subpopulationen erhöht (nicht gezeigt).

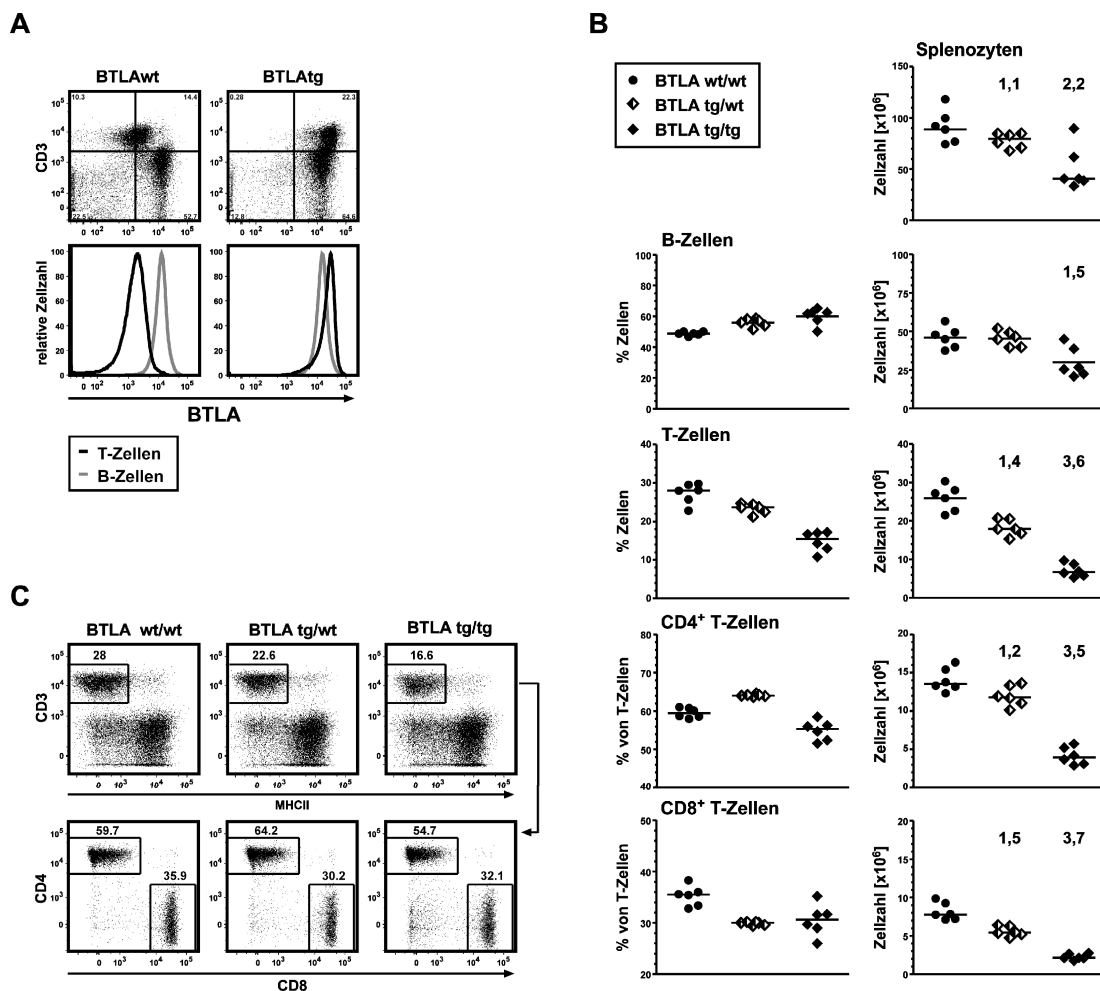


**Abb. 18: T- und B-Zellpopulationen in BTLA-defizienten Mäusen**

Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozytenpopulationen in Milzen von zwei Monate alten BTLA-defizienten Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 wt-Tieren. A/B) B-Zellen, C/D) T-Zellen, wobei in A) und C) die Definition der analysierten Subpopulationen exemplarisch dargestellt ist, in B) und D) der prozentuale Anteil der entsprechenden Zellen bezüglich der angegebenen Populationen für mehrere Einzeltiere (n=7). A) Ausgehend von der gesamten B-Zellpopulation (B220<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>Ly-6G/C<sup>-</sup>) wurde der Anteil der Transitional-B-Zellen (CD93<sup>+</sup>) bestimmt, und ebenso eine weitere Unterteilung reifer B-Zellen (CD93<sup>-</sup>) bezüglich ihrer IgD und IgM Expression vorgenommen. Damit konnten in den BTLA-defizienten Tieren keine Veränderungen bezüglich der B-Zellen festgestellt werden (B). C) Ausgehend von der CD3<sup>+</sup>B220<sup>-</sup> TZ-Population wurden sowohl die CD4<sup>+</sup> als auch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen in naive (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>), *Central-Memory* T-Zellen (TCM, CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) und *Effector-Memory* T-Zellen (TEM, CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) unterteilt. Dabei sind repräsentative TZ-Färbungen sowohl eines wt und eines BTLA-defizienten Tieres dargestellt. Bei unverändertem T-Zellanteil war eine deutliche Verschiebung des CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> TZ-Verhältnisses in den BTLA-defizienten Tieren festzustellen, wobei der relative Anteil der T-Gedächtniszellen unverändert blieb. Gezeigt ist 1 von mehr als 3 vergleichbaren Experimenten. Gleiche Ergebnisse wurden für Zellen der peripheren Lymphknoten erhalten (nicht gezeigt).



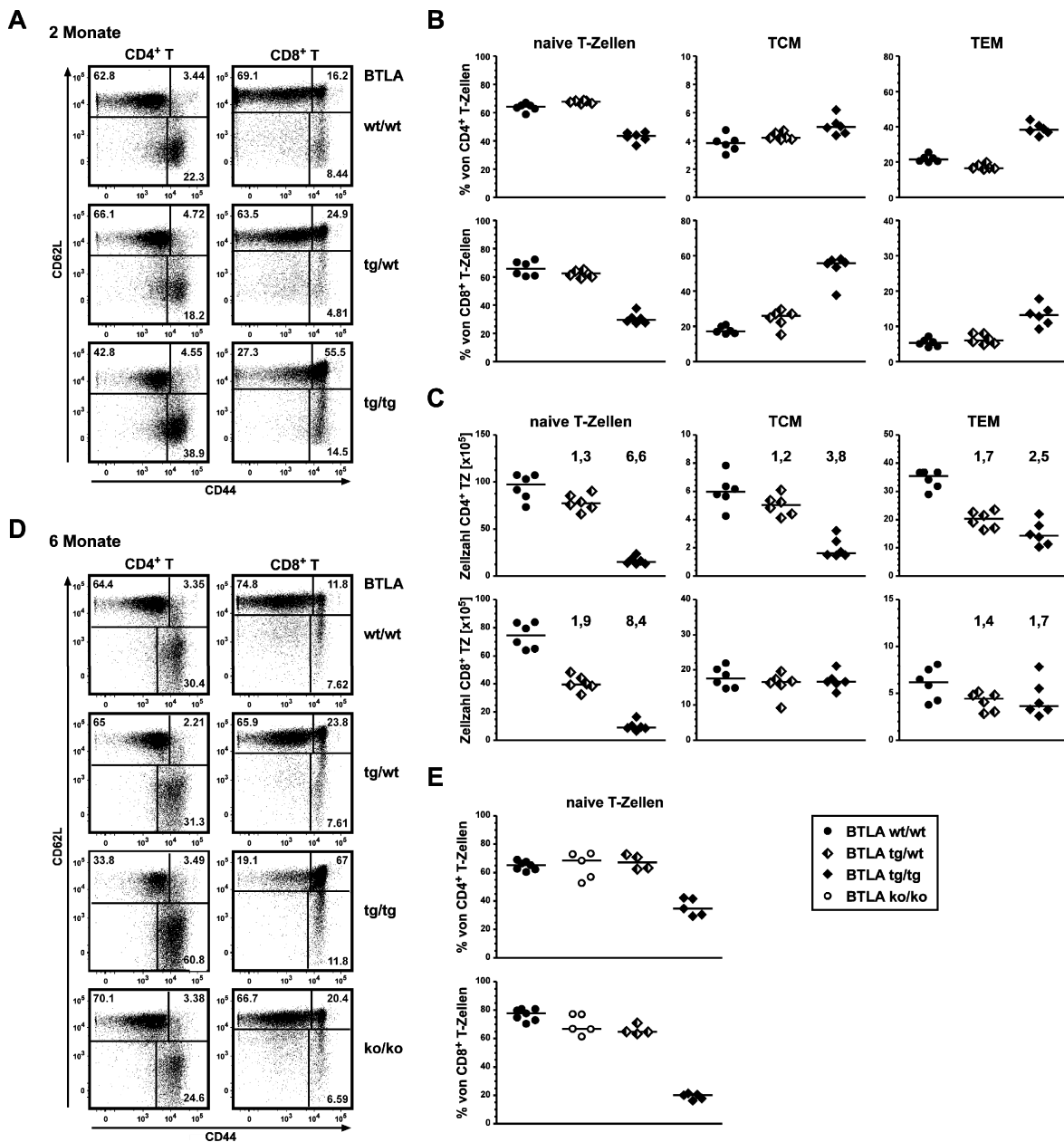
Bei BTLAtg Mäusen, in denen BTLA selektiv auf T-Zellen überexprimiert wird (Abb. 19 A), fiel eine deutlich reduzierte T-Zellzahl (relativ und absolut) auf, was sich ebenso auf die Gesamtsplenozytenzahl auswirkte (Abb. 19 B, C). Dabei waren die beobachteten Effekte in homozygot transgenen (tg/tg) Mäusen stärker ausgeprägt, als in den heterozygot transgenen (tg/wt), die BTLA-Expression auf den T-Zellen unterschied sich dabei um Faktor zwei (MFI für BTLA auf wt T-Zellen etwa 2500, tg/wt etwa 20000, tg/tg 40000, Vgl. Abb. 22 A). Geringfügig stärkere Auswirkungen auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation führten auch in den BTLAtg Tieren zu veränderten CD4/CD8 Verhältnissen (Abb. 19 B, C).



**Abb. 19: T- und B-Zellpopulationen in Mäusen mit T-Zellspezifischer Überexpression von BTLA**

Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozytenpopulationen in Milzen von zwei Monate alten BTLAtg Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 wt Tieren. A) BTLA wird selektiv auf T-Zellen der BTLAtg Mäuse überexprimiert. Färbung von Splenozyten mit dem BTLA-spezifischen mAK mBT-1622, dargestellt in Kombination mit der anti-CD3 Färbung für T-Zellen oder in der Histogrammdarstellung mit übereinander gelegten Färbungen der T-Zellen (schwarz) und B-Zellen (grau). B) Prozentuale Anteile und absolute Zellzahl der entsprechenden Zellpopulationen für mehrere Einzeltiere (n=6). Der Anteil an T- und B-Zellen bezieht sich jeweils auf die gesamte Splenozytenpopulation. Die analysierten Subpopulationen wurden wie in Abb. 18 gezeigt definiert. Angegeben ist ebenfalls der Faktor, um den die Zellzahlen der transgenen Tiere im Vergleich zu den wt-Tieren reduziert waren. C) Repräsentative Färbungen sowohl eines wt Tieres, einer heterozygoten (tg/wt) und homozygoten (tg/tg) BTLAtg Maus. Gleiche Ergebnisse wurden für Zellen der peripheren Lymphknoten erhalten (nicht gezeigt).

Weiterhin konnten in homozygot transgenen Tieren stark erhöhte prozentuale Anteile an T-Gedächtniszellen innerhalb beider TZ-Subpopulationen festgestellt werden (Abb. 20), so dass in diesen Tieren nur noch 25–40 % der T-Zellen naiv ( $CD62L^+ CD44^-$ ) waren, im Gegensatz zu 70 % in den Wildtyptieren.



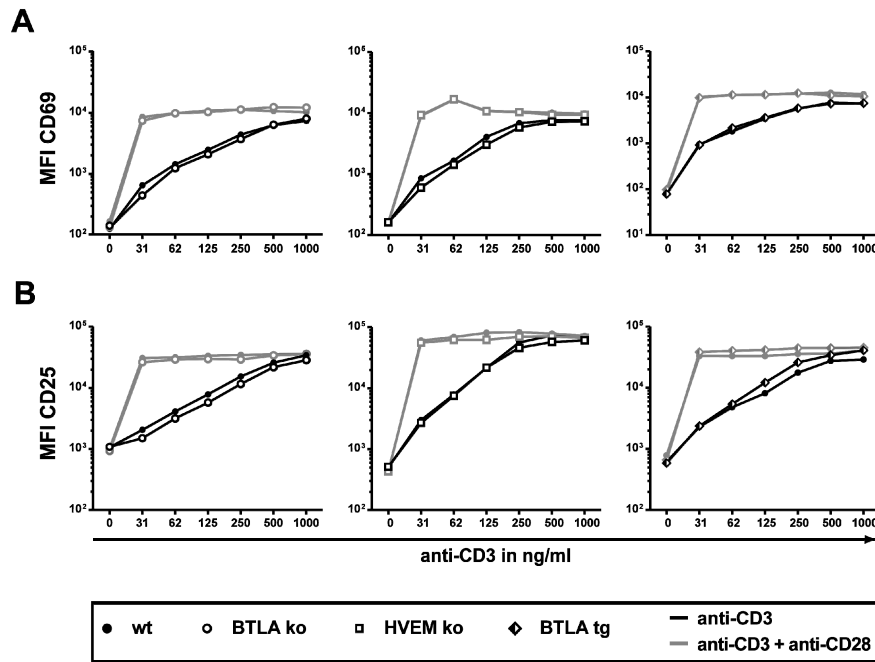
**Abb. 20: Analyse von T-Gedächtniszellen in Mäusen mit T-Zellspezifischer Überexpression von BTLA**

Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellsubpopulationen in Milzen von BTLA<sup>tg</sup> Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 wt Tieren im Alter von 2 Monaten (A-C) bzw. 6 Monaten (D und E). A) und D) Repräsentative T-Zellfärbungen von Splenozyten bezüglich der Oberflächenantigene CD62L und CD44 sowohl eines wt Tieres und jeweils eines Tieres mit genetisch veränderter BTLA-Expression. Prozentuale Anteile (B und E) und absolute Zellzahlen (C) der entsprechenden T-Zellsubpopulationen für mehrere Einzeltiere (n=4 bis 7). Angegeben ist ebenfalls der Faktor, um den die jeweiligen Zellzahlen der transgenen Tiere im Vergleich zu den wt-Tieren reduziert waren. Die analysierten Subpopulationen wurden wie in Abb. 19 gezeigt definiert. Gezeigt ist ein Ergebnis von zwei unabhängigen Analysen.

Dieser scheinbare Anstieg der T-Gedächtniszellen lässt sich jedoch auf die stärkere Reduktion von naiven T-Zellen in den BTLA<sup>tg</sup> Tieren zurückführen. Die absolute Zellzahl der naiven Zellen war, im Vergleich zu wt-Tieren, etwa 10-fach verringert, der Großteil der T-Gedächtniszellen nur 2–5-fach, die Zellzahl der CD8<sup>+</sup> *Central-Memory* T-Zellen blieb im Gegensatz zu allen anderen Zellpopulationen sogar relativ unverändert (Abb. 20 C). Sowohl bei den heterozygot transgenen Tieren als auch bei den BTLA-defizienten Tieren wurde eine Zunahme des relativen Anteils an T-Gedächtniszellen dagegen erst bei älteren Tieren beobachtet. Allerdings waren hier die Unterschiede zu den wt-Tieren viel geringer und nur auf die CD8<sup>+</sup> TZ-Population beschränkt (Abb. 20 D, E). In den transgenen Mäusen wurde dieser Effekt jedoch durch die Abnahme der T-Zellen bewirkt, was für die BTLA-defizienten Mäuse nicht der Fall war (nicht gezeigt). Da B-Zellen in wt und den transgenen Mäusen gleiche Mengen BTLA exprimierten (Abb. 19 A), kann die beobachtete Reduktion der B-Zellzahlen in den homozygot transgenen Mäusen (Abb. 19 B) nur eine indirekte Folge der BTLA-Überexpression auf den T-Zellen sein. Zur Beurteilung des funktionellen Beitrags von BTLA, der sich hier als Beteiligung an der Entscheidung zum Überleben von Zellen besonders zwischen naiven gegenüber T-Gedächtniszellen andeutet, sind weiterführende Analysen notwendig. Auffallend war jedoch auch bei der Analyse dieser Mäuse, dass sich Veränderungen im BTLA-HVEM System unterschiedlich auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen auswirken.

### **3.3.2 Durch Veränderung des BTLA-Ausgangsniveaus wird die initiale T-Zellaktivierung nicht beeinflusst**

Ob durch die Entwicklung der T-Zellen in Mäusen mit verändertem BTLA-HVEM-System auch die Reaktivität dieser Zellen beeinflusst wurde, wurde durch Stimulation von isolierten T-Zellen aus 8–12 Wochen alten Mäusen untersucht. Hierfür wurden T-Zellen aus BTLA-defizienten, HVEM-defizienten und heterozygoten BTLA<sup>tg</sup> Mäusen verwendet, die wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben normale Anteile an naiven und Gedächtnis-T-Zellen aufwiesen. Weder das Fehlen, noch die Überexpression von BTLA wirkte sich deutlich auf die Aktivierung der T-Zellen aus. Sowohl nach Stimulation allein über den T-Zellrezeptor als auch mit Kostimulation über CD28 waren die Expressionen verschiedener Aktivierungsantigene auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den veränderten Mäusen mit wt Mäusen vergleichbar (Abb. 21). Auch die Viabilität und die Proliferation der T-Zellen nach Aktivierung wurde durch das Fehlen von BTLA oder HVEM nicht verändert (nicht gezeigt).

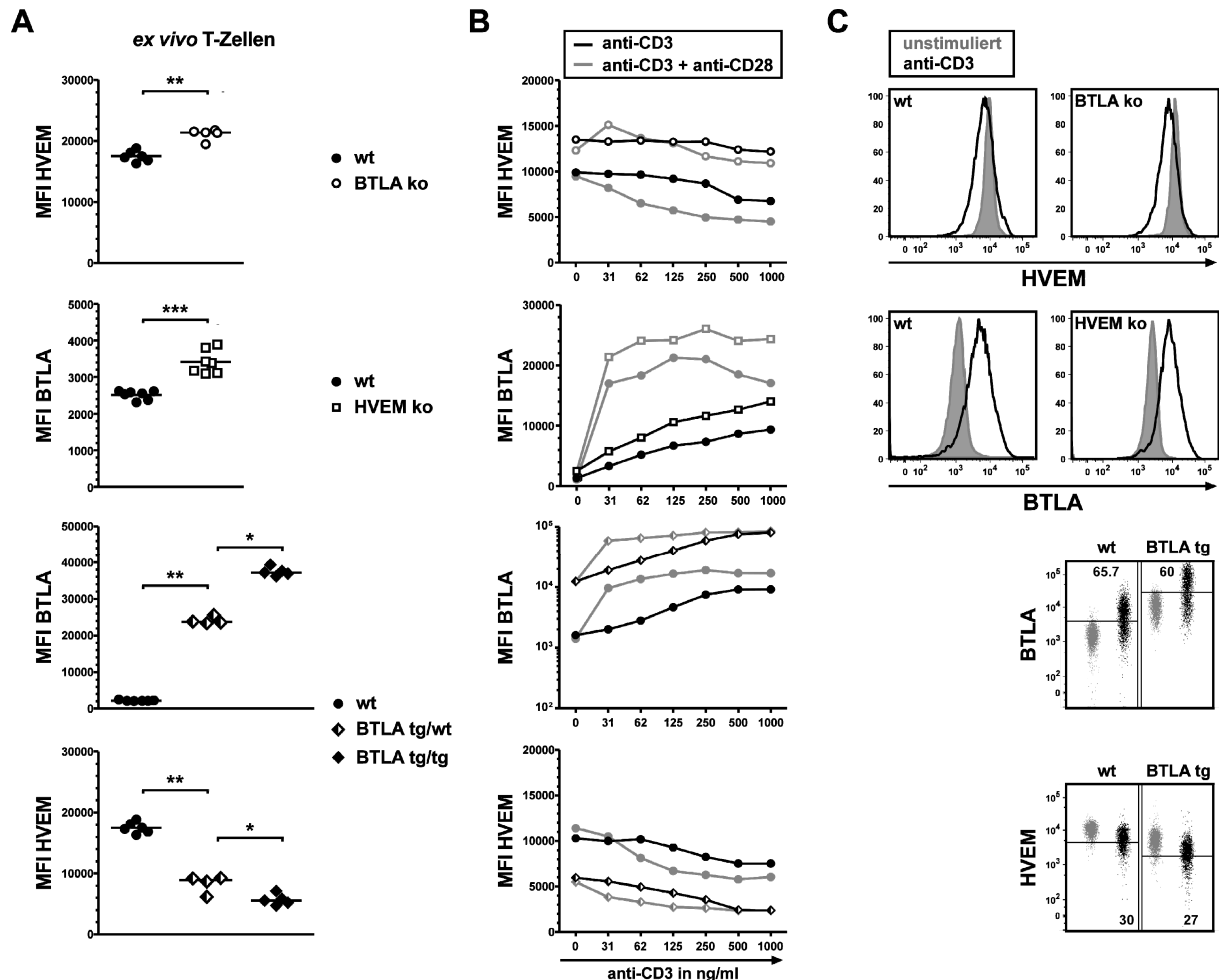


**Abb. 21: Analyse der initialen Aktivierung von T-Zellen der genetisch veränderten Mäuse**

Sortierte T-Zellen aus den Milzen von BTLA- und HVEM-defizienten Tieren bzw. heterozygot BTLAtg Mäusen wurden in Mikrotiterplatten mit verschiedenen Konzentrationen an immobilisiertem anti-CD3 mAK in Anwesenheit von anti-CD28 mAK (graue Graphen) oder eines Isotyp-mAK (schwarze Graphen) stimuliert und die aktivierungsinduzierte Oberflächenexpression von CD69 (A) und CD25 (B) auf den T-Zellen nach 20 h durchflusszytometrisch analysiert. Zum Vergleich sind in jedem Experiment auch T-Zellen aus C57BL/6 wt-Tieren (●) stimuliert worden. Angegeben sind jeweils die Werte der mittleren Fluoreszenzintensitäten der entsprechenden Antikörperfärbungen bei den angegebenen Konzentrationen an anti-CD3 mAK. Dargestellt ist die Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus einem repräsentativen Experiment von mindestens zwei Experimenten. Gleiche Ergebnisse wurden für die Stimulation CD8<sup>+</sup> T-Zellen erhalten (nicht gezeigt).

Da im Verlauf einer normalen TZ-Aktivierung die Expression von BTLA und HVEM auf der Zelloberfläche stark reguliert wurde, sollte dieser Aspekt auch auf den genetisch veränderten T-Zellen untersucht werden. Interessanterweise scheint sich hier allein die Veränderung eines der beiden Moleküle auf die Expression des Partners im Ruhezustand auszuwirken (Abb. 22 A). BTLA-defiziente T-Zellen exprimieren mehr HVEM, HVEM-defiziente T-Zellen mehr BTLA. Ist wie auf T-Zellen aus den BTLAtg Mäusen mehr BTLA vorhanden, so ist die HVEM-Expression auf diesen T-Zellen im Vergleich zu wt T-Zellen reduziert. Auf diese gegenseitige Regulation der beiden Interaktionspartner soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden, sie ist aber Gegenstand aktueller Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Kroczyk am RKI, Berlin. Trotz des unterschiedlichen Ausgangsniveaus konnte auch in Abwesenheit eines der beiden Moleküle auf T-Zellen die gleiche Regulation des Partnermoleküls beobachtet werden wie auf wt T-Zellen (Abb. 22 B, C). So wurde die HVEM-Expression auch auf aktivierten BTLA-defizienten T-Zellen herunterreguliert, mit in etwa parallelen Verlauf zu der Expression auf wt T-Zellen, nur beginnend mit höherem Ausgangs-

niveau. Ebenso stieg die BTLA-Expression auf HVEM-defizienten T-Zellen nach Aktivierung mit der gleichen Kinetik wie auf wt-T-Zellen an. Auch das BTLA-Transgen unterliegt scheinbar der normalen Regulation des BTLA-Moleküls nach T-Zellaktivierung und verändert nicht die Regulation der HVEM-Expression auf den T-Zellen.



**Abb. 22: Expression von BTLA und HVEM auf T-Zellen der genetisch veränderten Mäuse**

Durchflusszytometrische Analyse der BTLA- und HVEM-Expression auf T-Zellen aus Milzen von BTLA- und HVEM-defizienten Tieren (ko) bzw. heterozygot BTLAtg Mäusen in Vergleich zu wt Tieren *ex vivo* (A) oder nach T-Zellstimulation (B und C). A) Mittlere Fluoreszenzintensitäten der HVEM- bzw. BTLA-Färbungen auf T-Zellen in den angegebenen Gruppen von Mäusen (n = 4 bis 7). Die T-Zellen wurden wie in Abb. 18 gezeigt definiert. B) und C) Sortierte T-Zellen aus den Milzen von BTLA- und HVEM-defizienten Tieren bzw. heterozygot BTLAtg Mäusen wurden wie in Abb. 21 beschrieben stimuliert, und die aktivierungsinduzierte Oberflächenexpression von BTLA bzw. HVEM auf den T-Zellen nach 60 h durchflusszytometrisch analysiert. Zum Vergleich sind in jedem Experiment auch T-Zellen aus C57BL/6 wt Tieren (●) stimuliert worden. Gezeigt sind jeweils die Werte der mittleren Fluoreszenzintensitäten der entsprechenden Antikörperfärbungen in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen an anti-CD3 mAK (B) und jeweils eine repräsentative Färbung (C) bei 1000 ng/ml anti-CD3 mAK für die defizienten T-Zellen und bei 250 ng/ml für die T-Zellen aus den BTLAtg Mäusen, wobei die Färbung auf den jeweils unstimulierten T-Zellen in grau mit abgebildet ist. Dargestellt ist die Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus einem repräsentativen Experiment von mindestens zwei Experimenten. Gleiche Ergebnisse wurden für CD8<sup>+</sup> T-Zellen erhalten (nicht gezeigt).

Eine veränderte BTLA-Expression an sich beeinflusst somit nicht die TZR-vermittelte Aktivierung von isolierten T-Zellen, auch wenn sie während der gesamten T-Zellentwicklung vorhanden war. Folglich ist eine Funktion von BTLA während der T-Zellaktivierung nach Bindung des Liganden anzunehmen, wodurch erst weitere Signale ausgelöst werden, die in der Lage sind auch TZR-Signale zu beeinflussen.

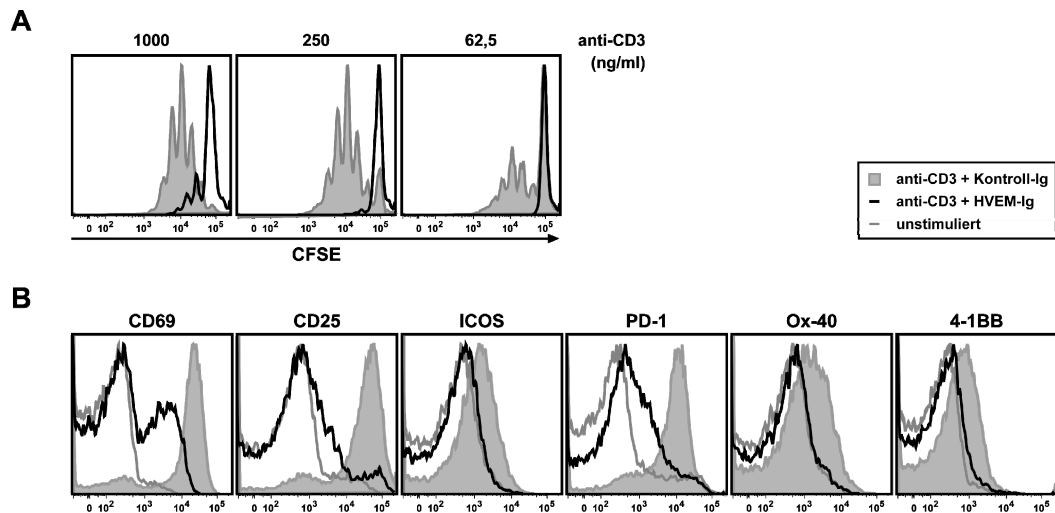
### **3.4 Funktionelle Relevanz des BTLA-HVEM Systems für die negative Modulation der T-Zellaktivierung**

Nachdem bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde, dass eine Modulation der Lymphozytenaktivierung durch BTLA möglich ist, sollte der Einfluss des BTLA-HVEM Systems bei der Stimulation von T-Zellen genauer charakterisiert werden. Dabei war es vor allem wichtig, einen Eindruck von der Stärke und dem Ausmaß dieser Beeinflussung von TZR-vermittelten Signalwegen zu erhalten, auch um den Stellenwert dieses Systems innerhalb eines Netzwerks von Molekülen, die die T-Zellaktivierung modulieren, definieren zu können.

#### **3.4.1 Durch HVEM wird ein starkes negatives Signal für die T-Zellaktivierung übermittelt**

Die weit verbreitete Expression von sowohl BTLA als auch HVEM auf beinahe allen an einer Immunantwort beteiligten Zellpopulationen ist ein nicht zu vernachlässigender Aspekt bei der experimentellen Analyse von Zellen nach physiologischer Stimulation *in vivo*. Dabei werden Wechselwirkungen zwischen beiden Molekülen auf den jeweils interagierenden Zellen in beide Richtungen stattfinden. Durch das komplexe Zusammenspiel auch vieler anderer beteiligter Moleküle wird damit die Beurteilung des Beitrags einzelner Signale für definierte Prozesse erschwert. Aus diesen Gründen wurde der Einfluss von BTLA auf die T-Zellaktivierung zuerst *in vitro* analysiert und dafür sortierte T-Zellen aus der Milz mit immobilisierten anti-CD3 mAK stimuliert. Dieses System bietet den Vorteil, im Zusammenhang mit der TZR-Stimulation gezielt definierte kostimulatorische Moleküle anzusprechen. Um dabei die Funktion von BTLA zu untersuchen, wurden die T-Zellen in Gegenwart des natürlichen BTLA-Liganden in Form von HVEM-Ig stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Zur Bestimmung des Einflusses auf die T-Zellproliferation wurden die Zellen vor Stimulation mit CFSE markiert und die durch Zellteilung bewirkte Abnahme der Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer detektiert. Dabei konnte auch mit diesem System der *in vitro* TZ-Aktivierung die bereits beschriebenen Inhibition der

TZ-Proliferation nach Kostimulation über BTLA (Han *et al.*, 2004; Sedy *et al.*, 2005) beobachtet werden (Abb. 23 A). Für eine Reihe von TZ-Oberflächenmolekülen ist eine Modulation von Signalen bei der TZ-Aktivierung und somit auch ein Einfluss auf die Proliferation beschrieben. Daher sollte ebenfalls analysiert werden, inwieweit auch der Zellteilung vorausgehende Prozesse durch HVEM-vermittelte Signale beeinflusst waren.



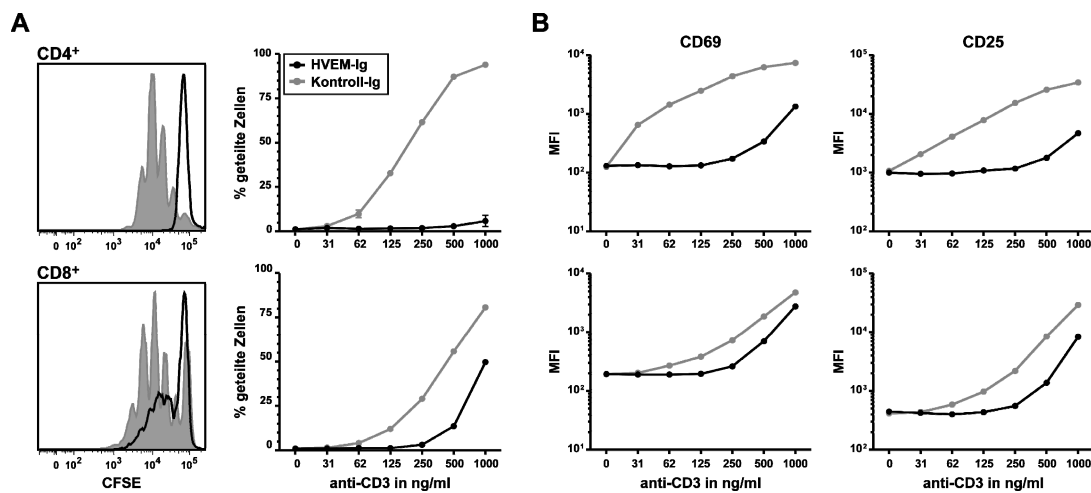
**Abb. 23: Inhibition der T-Zellaktivierung durch HVEM**

Sortierte T-Zellen wurden mit CFSE markiert, danach in Mikrotiterplatten mit immobilisiertem anti-CD3 mAK in Anwesenheit von HVEM-Ig (schwarze Histogramme) oder Kontroll-Ig (grau ausgefüllte Histogramme) stimuliert und nach verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert. A) Proliferation der T-Zellen nach 66 h Stimulation mit der angegebenen Menge anti-CD3 mAK. B) Oberflächenexpression verschiedener Aktivierungsantigene nach 20 h T-Zellstimulation mit 250 ng/ml anti-CD3 mAK. Die Expression der verschiedenen Moleküle auf unstimulierten T-Zellen ist jeweils als offenes graues Histogramm dargestellt. Gezeigt ist das Ergebnis aus einem repräsentativen Experiment von mindestens drei weiteren Experimenten.

Tatsächlich konnten Veränderungen in der Expression verschiedener aktivierungsinduzierter Oberflächenmoleküle nach TZ-Stimulation in Gegenwart von HVEM festgestellt werden, die deutlich über die bisher beschriebene BTLA-Wirkung hinausgehen (Krieg *et al.*, 2005). So kam es nicht nur zur Inhibition der IL-2R (CD25) Expression, auch die Expression des frühen Aktivierungsantigens CD69 wurde gehemmt. Darüber hinaus wurde eine Suppression der Expression anderer kostimulatorischer Moleküle, wie ICOS, PD-1, PD-L1, aber auch die der Mitglieder der TNF-Familie OX40 und 4-1BB beobachtet (Abb. 23 B). Die HVEM Bindung an die T-Zelle während einer TZR-Stimulation führte somit zu einer umfassenden Blockade der TZ-Aktivierung und Proliferation. Die beschriebene Inhibition konnte bereits 6 h nach Aktivierung beobachtet werden (nicht gezeigt), was zeigt, dass durch HVEM-vermittelte Signale die Möglichkeit gegeben ist, bereits zu frühen Zeitpunkten der T-Zellaktivierung, das Schicksal der T-Zellen durch Eingriff in TZR-Signalwege zu beeinflussen. Mit löslichem HVEM-Ig konnte keine Veränderung der TZ-Aktivierung beobachtet werden (nicht gezeigt).

### 3.4.2 Die HVEM vermittelte Inhibition der T-Zellaktivierung ist auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen stärker ausgeprägt

Bei genauerer Betrachtung dieser Inhibition der T-Zellaktivierung fielen jedoch deutliche Unterschiede bezüglich der Stärke des Einflusses von HVEM vermittelten Signalen zwischen den verschiedenen TZ-Subpopulationen auf. Alle von HVEM ausgelösten Effekte, sowohl die Aktivierung als auch die Proliferation betreffend, waren deutlich ausgeprägter auf CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu beobachten. Wie in Abb. 24 zu sehen, wurde die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation vollständig in Anwesenheit des HVEM-Fusionsproteins blockiert. Auch die Expression von aktivierungsinduzierten Oberflächenmolekülen wurde auf diesen Zellen deutlich inhibiert (Abb. 24 B). Im Gegensatz dazu waren die durch HVEM-Ig ausgelösten Veränderungen auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation wesentlich schwächer, mit dem Ergebnis einer immer noch signifikanten Aktivierung und Proliferation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Gegenwart von HVEM-Ig.



**Abb. 24: Differenzielle Inhibition der T-Zellaktivierung durch HVEM auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

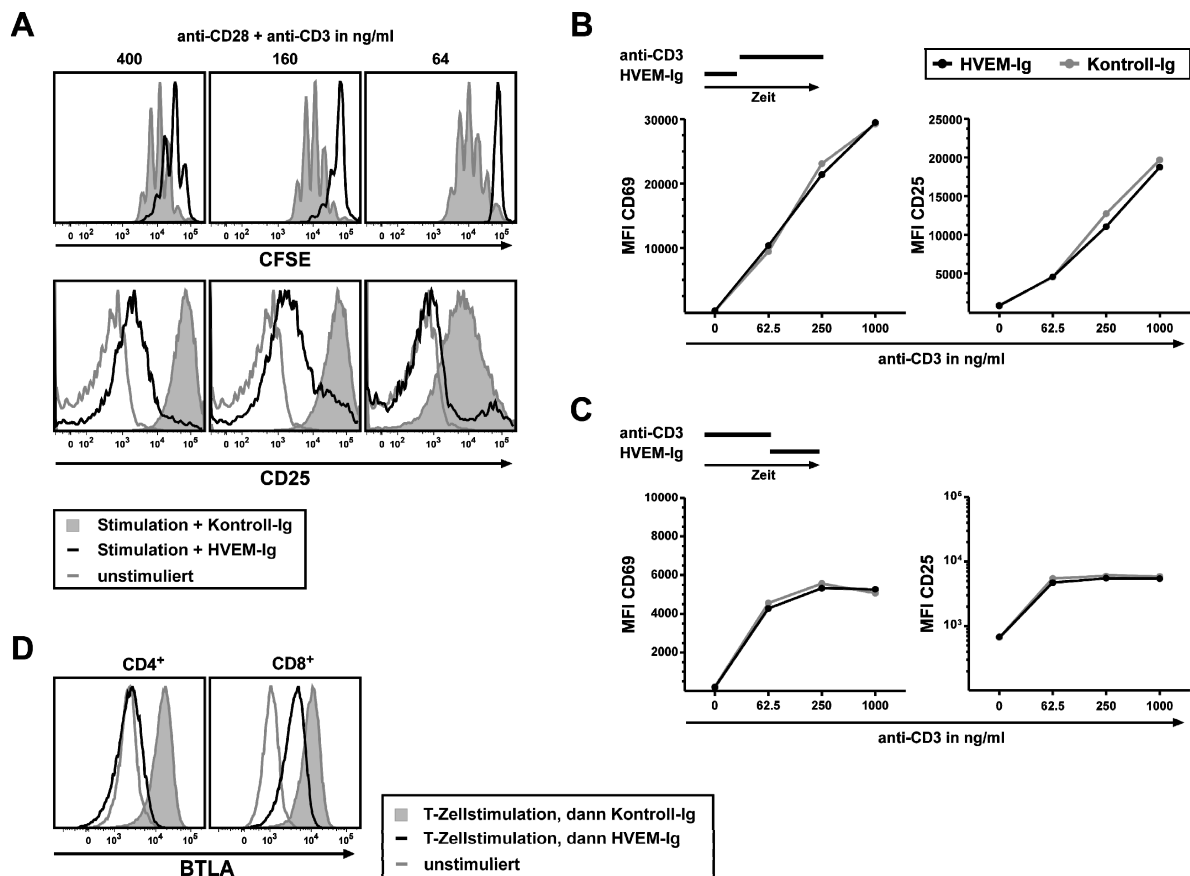
Sortierte T-Zellen wurden wie in Abb. 23 beschrieben in Anwesenheit von HVEM-Ig (schwarze Graphen) oder Kontroll-Ig (graue Graphen) stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden sowohl die CD4<sup>+</sup> (obere Reihe) als auch die CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation (untere Reihe) getrennt betrachtet. A) Proliferation der T-Zellen nach 66 h als exemplarische Histogrammdarstellung und als Anteil geteilter Zellen der T-Zellsubpopulation in Abhängigkeit von der Menge an anti-CD3 mAK. B) Oberflächenexpression der Aktivierungsantigene CD69 und CD25 aufgetragen als mittlere Fluoreszenzintensität der Färbung nach 20 h T-Zellstimulation ebenfalls in Abhängigkeit von der anti-CD3 mAK Konzentration. Gezeigt ist das Ergebnis aus einem repräsentativen Experiment von mindestens drei weiteren Experimenten.

Damit ist HVEM ein sehr potenter Inhibitor der TZR-vermittelten Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, spielt jedoch für die Abbremsung einer CD8<sup>+</sup> TZ-Aktivierung eine nicht ganz so prominente Rolle.



### 3.4.3 Die HVEM-vermittelte T-Zellsuppression ist abhängig vom TZR-Signal und erfolgt auch in Anwesenheit starker positiver Signale

Um den Einfluss des negativen Signals von HVEM auf die TZ-Aktivierung genauer beurteilen zu können, wurde die Inhibition durch HVEM-Ig bei unterschiedlicher Aktivierungsstärke der T-Zellen untersucht. Neben der standardmäßig durchgeführten Variation der TZR-Stimulation über verschiedene anti-CD3 mAK Konzentrationen (Abb. 23 und Abb. 24), wurde die HVEM Wirkung auch in Gegenwart von CD28 vermittelter Kostimulation analysiert (Abb. 25).



**Abb. 25: Einfluss verschiedener Signale auf die von HVEM vermittelte Wirkung**

Untersuchung der HVEM-vermittelten TZ-Suppression in Anwesenheit von positiver Kostimulation über CD28 (A) und Abhängigkeit der HVEM-Wirkung vom TZR-Signal (B–D). Sortierte T-Zellen wurden mit immobilisierten mAK stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. A) Simulation der T-Zellen mit den angegebenen Mengen anti-CD3 in Anwesenheit von anti-CD28 mAK und HVEM-Ig (schwarze Histogramme) oder Kontroll-Ig (graue ausgefüllte Histogramme) für 66 h. Analyse der Proliferation (obere Reihe) und der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 (untere Reihe) auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen. B– D) Zeitliche Trennung des HVEM-Signals vom TZR-Signal. B) Die Zellen wurden für 6 h auf Mikrotiterplatten mit HVEM-Ig (schwarze Graphen) oder Kontroll-Ig (graue Graphen) inkubiert und anschließend auf Platten mit den angegebenen Mengen anti-CD3 für weitere 19 h stimuliert. Analyse der Aktivierung anhand der Expression von CD69 und CD25 in Abhängigkeit von der anti-CD3 mAK Konzentration. C) Die Zellen wurden für 25 h mit den angegebenen Mengen anti-CD3 mAK in Anwesenheit von anti-CD28 mAK stimuliert und anschließend für weitere 17 h auf

Mikrotiterplatten mit HVEM-Ig (schwarze Graphen) oder Kontroll-Ig (graue Graphen) inkubiert. Analyse wie in B). D) Vorstimulation der Zellen wie in C) mit 1000 ng/ml anti-CD3 und Analyse der BTLA-Expression auf den Zellen nach weiteren 17 h Kultur mit HVEM-Ig (schwarze Graphen) oder Kontroll-Ig (graue Graphen) ohne weiteren TZR-Stimulus. Gezeigt ist ein Ergebnis von 2 vergleichbaren Experimenten.

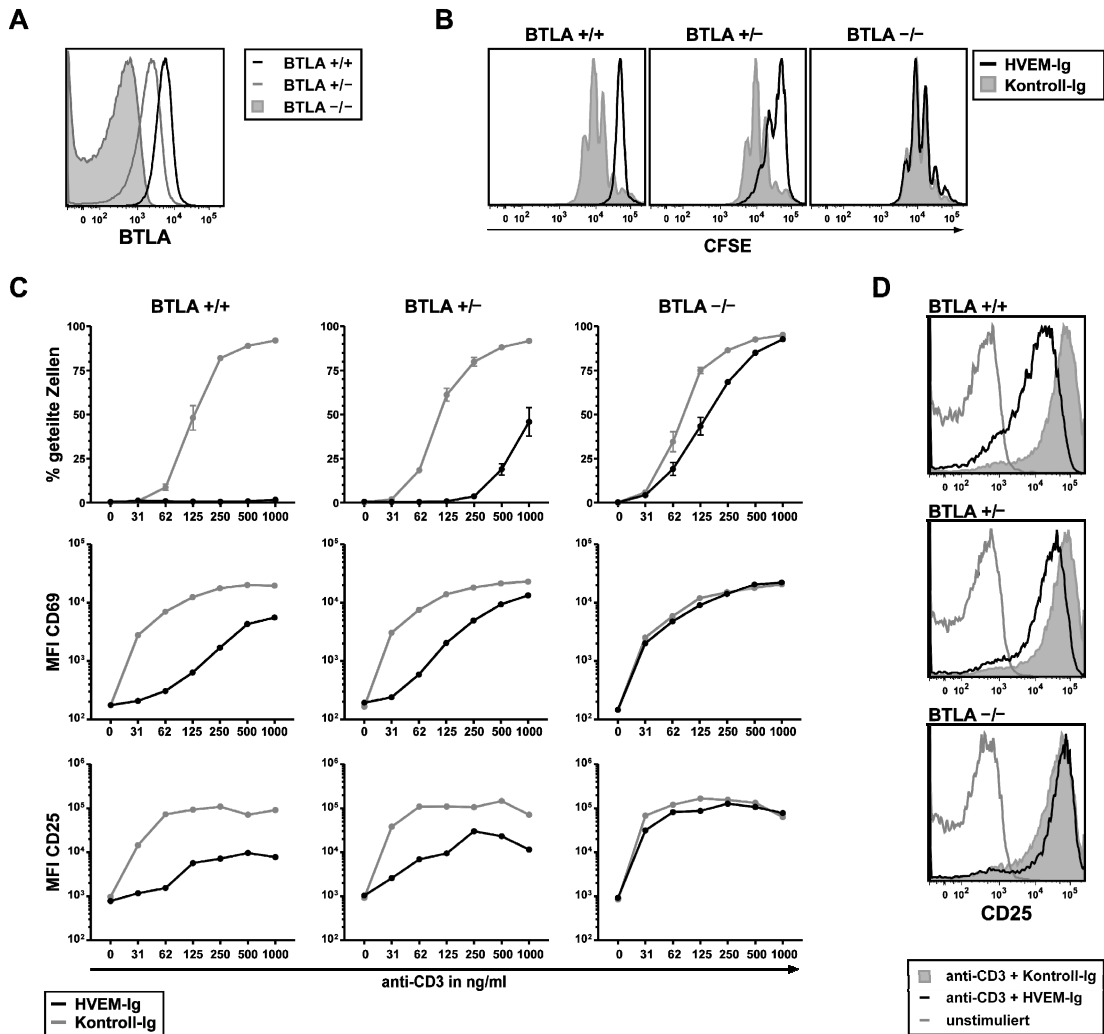
Eine Hemmung der TZ-Aktivierung und Proliferation durch HVEM konnte auch beobachtet werden, wenn gleichzeitig ein starkes positives Signal über CD28 vermittelt wurde (Abb. 25 A), allerdings abgeschwächer als bei alleiniger Stimulation über den TZR. Selbst bei bereits aktivierten T-Zellen führten spätere zusätzliche HVEM Signale zu der beschriebenen Inhibition (nicht gezeigt). Inwieweit die negativen Signale über HVEM allein durch Bindung an den Rezeptor ausgelöst oder nur im Zusammenhang mit der Aktivierung von T-Zellen über den TZR wirksam waren, wurde ebenso untersucht. Um die beiden Signale zeitlich voneinander zu trennen, wurden sortierte T-Zellen entweder zuerst mit HVEM-Ig inkubiert und danach über den TZR mit anti-CD3 mAK stimuliert, oder aber erst stimuliert und dann ohne weitere TZR-Stimulation in Anwesenheit von HVEM-Ig weiterkultiviert. Wie die Analyse der T-Zellen zeigte, hatte die HVEM-Bindung zeitlich vor T-Zellstimulation keinen Einfluss auf die anschließende Aktivierung der Zellen (Abb. 25 B). Auch nach Wegfall des TZR-Stimulus wirkte sich die Bindung von HVEM-Ig nicht weiter auf den Aktivierungszustand der Zellen aus (Abb. 25 C). Jedoch reichte allein die Bindung von HVEM zur Herunterregulation der BTLA-Expression auf der Oberfläche der aktivierten T-Zellen aus (Abb. 25 D). Für eine Suppression der T-Zellaktivierung durch HVEM ist demnach ein gleichzeitiges TZR-Signal notwendig, ist dies gegeben, ist das BTLA-HVEM System deutlich an der negativen T-Zellkostimulation beteiligt.

#### **3.4.4 Der inhibitorische Effekt von HVEM ist abhängig von der BTLA-Expressionsstärke**

Nachdem in Kapitel 3.4.2 gezeigt werden konnte, dass die  $CD4^+$  T-Zellaktivierung stärker durch HVEM-Ig gehemmt wurde als die der  $CD8^+$  T-Zellen, sollte untersucht werden, ob diese auffallenden Unterschiede in der Suszeptibilität der T-Zellsubpopulationen gegenüber der HVEM vermittelten Inhibition auf inhärenten Eigenschaften dieser Zellentypen beruhten, oder aber durch die unterschiedliche Expression des HVEM-Bindungspartners BTLA (Kap. 3.2.4.3) bewirkt wurden. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Einfluss von HVEM auf die Aktivierung von T-Zellen untersucht, die verschiedene Mengen an BTLA auf der Zelloberfläche exprimierten. Dafür wurden T-Zellen aus den in Abschnitt 3.3 beschrieben genetisch veränderten Mäusen verwendet.

### 3.4.4.1 Die Reduktion der BTLA Oberflächenexpression auf T- Zellen verringert die HVEM vermittelte Inhibition der Zellaktivierung

Zuerst wurde untersucht, wie sich eine Verringerung der BTLA-Oberflächendichte auf die von HVEM vermittelten Signale während einer TZ-Aktivierung auswirkt. Dazu wurde die Aktivierung von T-Zellen aus wt (BTLA<sup>+/+</sup>), heterozygoten BTLA<sup>+/-</sup> und BTLA-defizienten (BTLA<sup>-/-</sup>) Mäusen in Gegenwart von HVEM untersucht (Abb. 26).



**Abb. 26: Abhängigkeit der von HVEM vermittelten Suppression von BTLA – BTLA-defiziente T-Zellen**

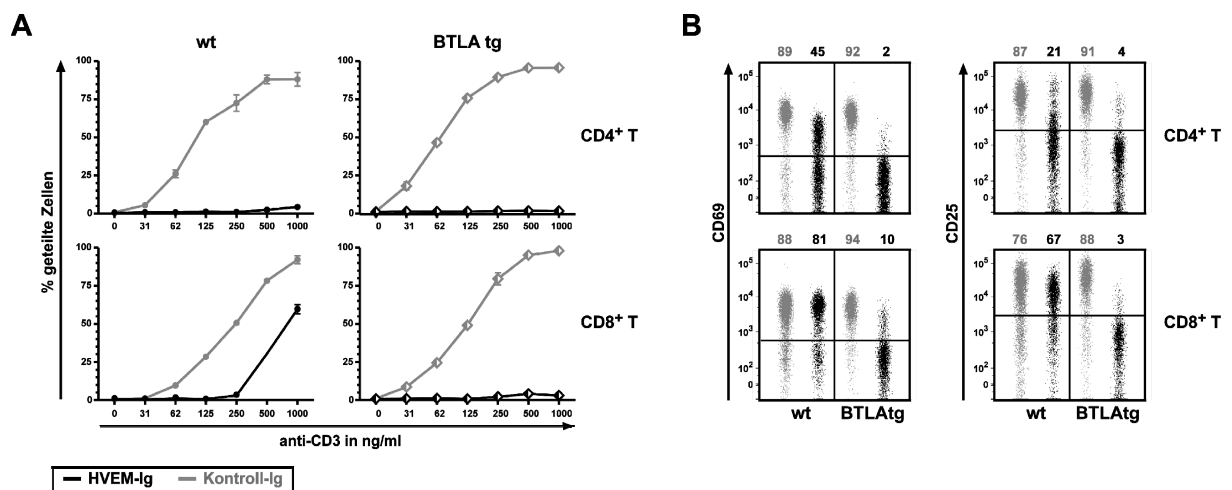
A) Vergleich der BTLA-Expression auf *ex vivo* T-Zellen von wt (BTLA<sup>+/+</sup>), heterozygoten (BTLA<sup>+/-</sup>) und BTLA-defizienten (BTLA<sup>-/-</sup>) Mäusen. B–D) Reduktion der TZ-Suppression über HVEM mit abnehmender BTLA-Expression auf den T-Zellen. Die Zellen wurden wie in Abb. 24 stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. B+C) Zellproliferation und Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen der entsprechenden Mäuse in Anwesenheit von HVEM-Ig (schwarze Graphen) oder Kontroll-Ig (graue Graphen) bei 1000 ng/ml anti-CD3 mAK (B) oder in Abhängigkeit von der anti-CD3 mAK Konzentration. D) Expression von CD25 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen der entsprechenden Mäuse bei Stimulation mit 1000 ng/ml anti-CD3 mAK. Die Zellproliferation und CD25-Expression ist nach 66 h Stimulation dargestellt, die CD69 Expression nach 20 h Stimulation. Gezeigt ist ein Ergebnis von mindestens 2 weiteren Experimenten.

T-Zellen aus BTLA<sup>+/-</sup> Mäusen exprimierten verglichen mit T-Zellen aus wt Mäusen genau die Hälfte der normalen BTLA Menge auf der Zelloberfläche (Abb. 26 A). Wie in Abb. 26 (B/C) gezeigt, war die HVEM vermittelte Suppression von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus den BTLA<sup>+/-</sup> Tieren verglichen mit der von wt T-Zellen deutlich geringer, eher vergleichbar mit der auf wt CD8<sup>+</sup> T-Zellen festgestellten. Es sei an dieser Stelle daran erinnert, dass sich auch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TZ aus wt Mäusen in ihrer BTLA-Expression um den Faktor 2 unterscheiden (Abb. 17). Eine Reduktion der BTLA-Expression auf die Hälfte des normalen wt Niveaus auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen, führte also zu deutlich weniger Inhibition der Aktivierung und Proliferation durch HVEM. Des Weiteren wurde bei BTLA-defizienten T-Zellen die Blockade der T-Zellaktivierung durch HVEM-Fusionsprotein beinahe vollständig aufgehoben, die T-Zellaktivierung war sogar mit der Kontrollstimulation vergleichbar, was zeigte, dass BTLA für die starke durch HVEM vermittelte Inhibition notwendig war. Gleiche Tendenzen waren auch auf CD8<sup>+</sup> TZ-Seite festzustellen. Da aber bereits die Aktivierung von wt CD8<sup>+</sup> T-Zellen deutlich weniger durch HVEM beeinflusst wurde (Kap 3.4.2), war hier der Einfluss einer reduzierten BTLA-Menge bei weitem nicht so ausgeprägt. Wie am Beispiel von CD25 gezeigt, konnte jedoch auch bei der CD8<sup>+</sup> TZ-Aktivierung ein veränderter HVEM Einfluss durch Reduktion der BTLA-Expression beobachtet werden (Abb. 26 D). In Gegenwart von HVEM-Ig war die durch Aktivierung induzierte CD25 Expression auf wt TZ signifikant reduziert, während diese Expression bei CD8<sup>+</sup> TZ aus BTLA<sup>+/-</sup> Mäusen deutlich weniger inhibiert wurde. Folglich sinkt mit geringerer BTLA-Expression auf den T-Zellen auch die suppressive Wirkung von HVEM-Ig auf die T-Zellaktivierung.

#### *3.4.4.2 Durch verstärkte BTLA-Expression auf den T-Zellen nimmt die negative Wirkung von HVEM vermittelten Signalen zu*

Um den Einfluss der BTLA-Expressionsstärke auch auf die Inhibition der CD8<sup>+</sup> T-Zellaktivierung genauer untersuchen zu können, und andererseits sicherzustellen, dass für die Wirkung von BTLA nicht allein ein bestimmter Schwellenwert der Oberflächenexpression ausschlaggebend war, wurden im gleichen experimentellen System zusätzlich T-Zellen mit gesteigerter BTLA-Expression auf der Zelloberfläche analysiert. Hierfür wurden die T-Zellen aus heterozygoten BTLA<sup>tg</sup> Mäusen isoliert, die verglichen mit wt T-Zellen etwa 10-fach mehr BTLA auf der Zelloberfläche exprimierten (Vgl. Abb. 22). Die normale Regulation des zusätzlichen BTLA-Transgens parallel zu endogenem BTLA (wodurch die Differenz der BTLA-Expression zu wt TZ auch während der T-Zellaktivierung erhalten blieb) wurde bereits in Kapitel 3.3.2 beschrieben. So wie die verringerte BTLA-Expression auf T-Zellen von

BTLA-defizienten Tieren zu einer abgeschwächten negativen Wirkung von HVEM-Ig führte (Kapitel 3.4.4.1), verstärkte die höhere Expression von BTLA auf den T-Zellen der BTLA-transgenen Mäuse die HVEM-vermittelte Suppression sowohl von  $CD4^+$  als auch  $CD8^+$  TZ (Abb. 27). Da bereits die Proliferation von wt  $CD4^+$  TZ vollständig in Anwesenheit von HVEM verhindert wurde, war die verstärkte Inhibition der Aktivierung von BTLA<sup>tg</sup>  $CD4^+$  TZ nur auf Ebene verschiedener Aktivierungsmarker zu beobachten. Darüber hinaus wurde nun auch bei  $CD8^+$  TZ aus BTLA<sup>tg</sup> Mäusen in Gegenwart von HVEM eine starke Inhibition der Expression verschiedener Aktivierungsmarker (Abb. 27 B) und eine vollständige Blockade der TZ-Proliferation (Abb. 27 A) festgestellt. Die starke Suppression der T-Zellaktivierung durch HVEM war demnach bei hoher BTLA-Expression auf der Zelloberfläche ebenso auf  $CD8^+$  TZ wie auf  $CD4^+$  TZ zu erreichen.



**Abb. 27: Abhängigkeit der von HVEM vermittelten Suppression von der BTLA-Expression – Überexpression von BTLA auf den T-Zellen**

Vergleich der suppressiven Wirkung von HVEM-Ig auf  $CD4^+$  (obere Reihe) und  $CD8^+$  T-Zellen (untere Reihe) aus heterozygot BTLA<sup>tg</sup> Mäusen oder C57BL/6 wt Tieren. Die Zellen wurden wie in Abb. 24 beschrieben stimuliert, und anschließend durchflusszytometrisch analysiert A) Proliferation der T-Zellsubpopulationen aus den angegebenen Mäusen in Abhängigkeit von der anti-CD3 mAK Konzentration nach 66 h Stimulation und B) Expression von CD69 und CD25 nach 22 h Stimulation mit 1000 ng/ml anti-CD3 mAK in Anwesenheit von HVEM-Ig (schwarz) oder Kontroll-Ig (grau). Die Anteile positiver Zellen für den entsprechenden Aktivierungsmarker bezogen auf die jeweilige T-Zellpopulation sind über jedem Plot angegeben, die Quadranten für die Analyse wurden an unstimulierten Zellen ausgerichtet (nicht gezeigt). Dargestellt ist ein Ergebnis von mindestens 2 weiteren Experimenten.

Diese Daten zeigen deutlich, dass die geringere Wirkung von HVEM vermittelten Signalen auf wt  $CD8^+$  TZ und gleichzeitig stärkere Wirkung auf  $CD4^+$  TZ keine inhärente Eigenschaft dieser Zellpopulationen ist, sondern durch Variation der Expressionsstärke von BTLA veränderbar war, und folglich durch die unterschiedliche BTLA-Expression auf den entsprechenden T-Zellsubpopulationen bewirkt wurde. Allerdings sollten in diesem

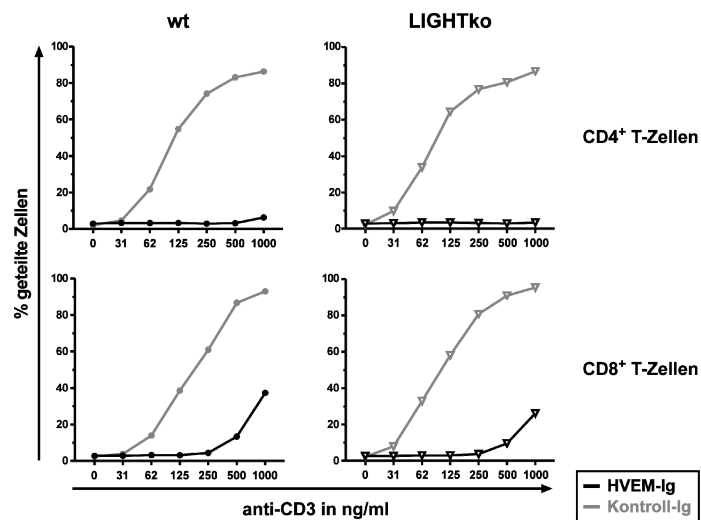
Zusammenhang auch andere Interaktionspartner von HVEM nicht außer Acht gelassen werden, die ebenfalls an der T-Zellsuppression beteiligt sein könnten.

### **3.4.5 Potentielle Rolle anderer HVEM-Liganden bei der Suppression der T-Zellaktivierung**

Neben BTLA besitzt HVEM als Mitglied der TNFR-Familie auch Bindungspartner innerhalb der TNF-Superfamilie, das trimere Lymphotoxin- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) und LIGHT. Wie erst kürzlich gezeigt wurde, ist auch CD160, ebenfalls Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie (IgSF), in der Lage an HVEM zu binden. Da in der Literatur für alle diese Moleküle eine Expression auf aktivierten Lymphozyten beschrieben wurde (Morel *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 2005), soll nachfolgend der potentielle Einfluss dieser HVEM-Interaktionspartner betrachtet werden. Für beide Liganden der TNF-SF wird eine Signalgebung über HVEM als Rezeptor angenommen, prinzipiell ist jedoch für LIGHT als Typ II Transmembranprotein ebenso die Übermittlung intrazelluläre Signale möglich (Shi *et al.*, 2002; Wan *et al.*, 2002). Da LT- $\alpha$  als Zytokin sezerniert wird, kommt es hingegen für intrazelluläre Signalübermittlung nicht in Frage. Dass über CD160 T-Zellkostimulation möglich ist, wurde bereits für humane T-Zellen *in vitro* mit anti-CD160 mAK gezeigt (Cai *et al.*, 2008).

#### ***3.4.5.1 LIGHT ist nicht an Suppression der T-Zellaktivierung durch HVEM beteiligt***

Da es nicht möglich war, die LIGHT Expression auf den Zellen direkt nachzuweisen, wurde der Einfluss von LIGHT auf die HVEM vermittelte Suppression durch Stimulation von TZ aus LIGHT-defizienten Mäusen untersucht. Die Abwesenheit von LIGHT wirkte sich nicht auf die Aktivierung der T-Zellen aus, und auch die in Gegenwart von HVEM zu beobachtende Inhibition der T-Zellaktivierung ließ sich im gleichen Ausmaß auf wt wie auch auf LIGHT-defizienten T-Zellen feststellen (Abb. 28). Somit konnte gezeigt werden, dass die von HVEM ausgelöste Inhibition nicht durch Bindung an LIGHT erfolgt war.

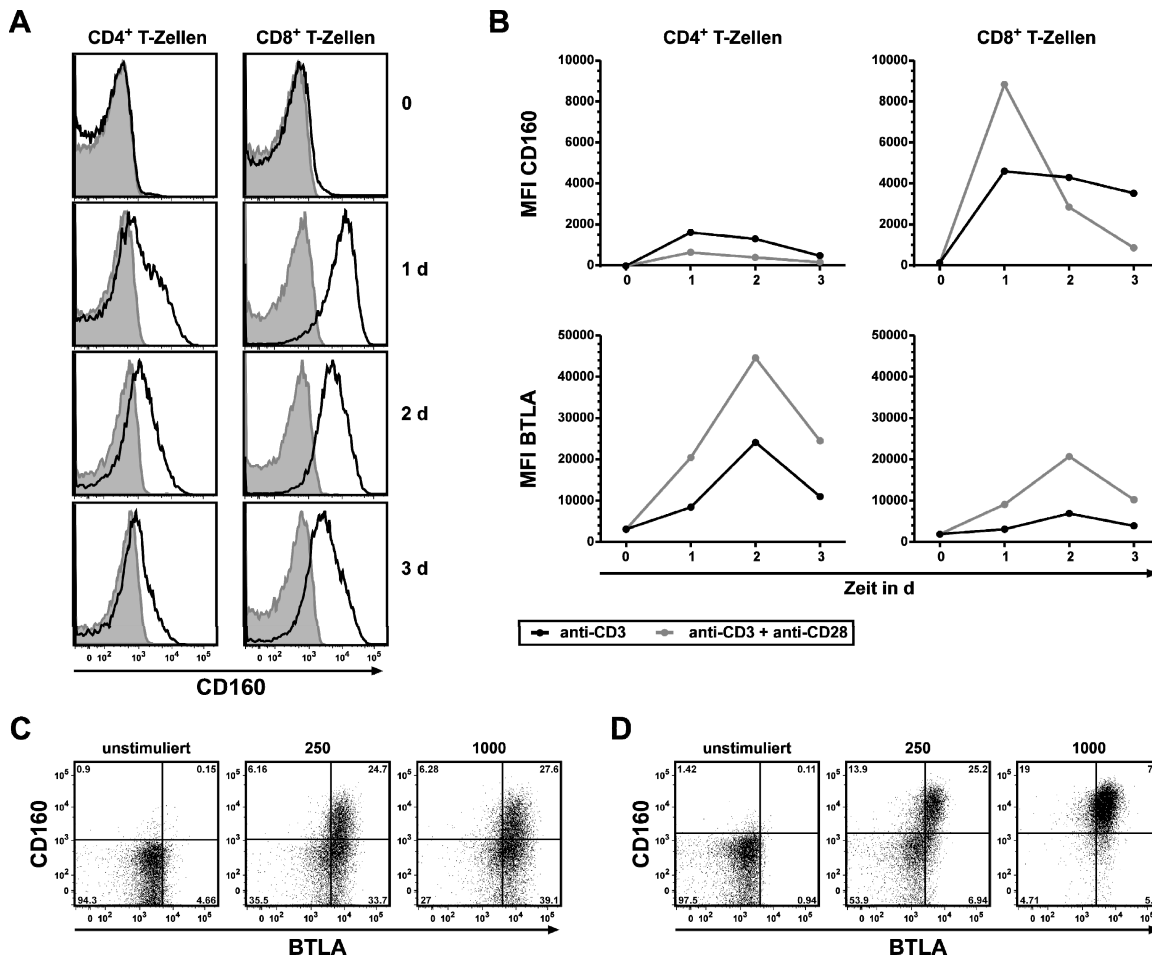


**Abb. 28: Suppression der Aktivierung von LIGHT-defizienten T-Zellen durch HVEM**

Vergleich der HVEM-Ig vermittelten Inhibition auf CD4<sup>+</sup> (obere Reihe) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (untere Reihe) aus LIGHT-defizienten Mäusen oder C57BL/6 wt Tieren. Die sortierten T-Zellen wurden wie in Abb. 24 beschrieben stimuliert und durchflusszytometrisch analysiert. Proliferation der T-Zellsubpopulationen aus den angegebenen Mäusen in Abhängigkeit von der anti-CD3 mAK Konzentration nach 66 h Stimulation in Anwesenheit von HVEM-Ig (schwarz) oder Kontroll-Ig (grau).

#### 3.4.5.2 Die durch T-Zellaktivierung induzierte CD160 Expression ist deutlich stärker auf der CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation ausgeprägt

Da bisher nur wenige Daten bezüglich der CD160 Expression im murinen System publiziert waren, wurde die Expression dieses Moleküls, besonders auch im Vergleich zu BTLA auf T-Zellen genauer analysiert. Wie in Abb. 29 gezeigt, war die CD160 Expression auf naiven CD4<sup>+</sup> TZ nicht vorhanden und auch auf naiven CD8<sup>+</sup> TZ wurde CD160 nur sehr schwach exprimiert. Nach Aktivierung konnte eine starke CD160 Oberflächenexpression auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen induziert werden, im Gegensatz dazu wurde auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine viel geringere CD160-Expression festgestellt (Abb. 29). Die Oberflächenexpression von CD160 begann auf beiden murinen TZ-Subpopulationen bereits nach 6 h zu steigen, und erreichte unter den gewählten experimentellen Bedingungen nach etwa 24 h ihren Maximalwert, verglichen mit der BTLA-Expression also etwa 12–18 h eher. Danach sank die CD160 Expression auf der Oberfläche der T-Zellen wieder ab. Nach Aktivierung exprimierten CD4<sup>+</sup> TZ somit deutlich mehr BTLA und weniger CD160 im Gegensatz zu CD8 TZ, die weniger BTLA aber deutlich mehr CD160 exprimierten. Infolgedessen war nur auf einem Teil der aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, deren BTLA-Expression bereits hochreguliert war, auch eine Koexpression von CD160 vorhanden, wohingegen auf aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen die CD160 Expression beinahe vollständig mit der erhöhten BTLA-Expression korrelierte (Abb. 29 C, D).



**Abb. 29: Differenzielle Expression von CD160 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

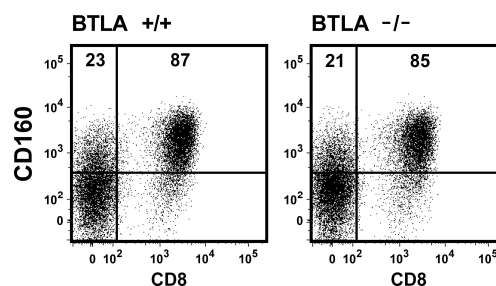
Vergleich der aktivierungsinduzierten CD160 Expression auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die sortierten T-Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit immobilisiertem anti-CD3 mAK stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert. A) CD160-Expression auf den T-Zellsubpopulationen nach Stimulation mit 1000 ng/ml immobilisiertem anti-CD3 mAK (schwarzes Histogramm) im Vergleich zu unstimulierte Zellen (grau ausgefüllte Histogramme) zu den angegebenen Zeitpunkten der Stimulation. B) Expression von CD160 auf den angegebenen Zellpopulationen in Abhängigkeit von der Stimulationszeit nach Aktivierung der Zellen mit 250 ng/ml immobilisiertem anti-CD3 mAK in Anwesenheit von anti-CD28 mAK (graue Graphen) oder eines Isotyp-mAK (schwarze Graphen). Zum Vergleich ist ebenfalls die Expressionskinetik von BTLA auf den entsprechenden Zellen abgebildet. C) und D) Korrelation der Expression von CD160 und BTLA nach 22 h T-Zellaktivierung mit den angegebenen Mengen an plattengebundenem anti-CD3 mAK (in ng/ml), auf CD4<sup>+</sup> (C) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (D). Dargestellt ist eins von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.4.5.3 Bei der durch HVEM vermittelten T-Zellsuppression scheint CD160 von geringerer Bedeutung

Da weder CD160-defiziente Zellen, noch spezifische blockierende Reagenzien zur Verfügung stehen, kann nur indirekt auf einen Beitrag von CD160 an der von HVEM vermittelten T-Zell-suppression geschlossen werden. Trotz der zusätzlich zu BTLA vorhandenen starken Expression von CD160 auf den CD8<sup>+</sup> TZ, war der Einfluss von HVEM-Ig auf die CD8<sup>+</sup> TZ-



Aktivierung nur gering (Kapitel 3.4.2). Des Weiteren konnte bei der Aktivierung von BTLA-defizienten TZ die starke suppressive Wirkung von HVEM nicht mehr beobachtet werden (Kapitel 3.4.4.1), obwohl weiterhin eine HVEM-Ig Bindung an die BTLA-defizienten T-Zellen stattfand, die mit der CD160 Expression auf den Zellen korrelierte (nicht gezeigt). Die Intensität der detektierten Färbung von HVEM-Ig auf aktivierten BTLA-defizienten T-Zellen war zwar geringerer als auf wt T-Zellen, jedoch ließ sich dieser Unterschied allein auf die fehlende BTLA-Expression zurückzuführen. Die detektierte Bindung von HVEM-Ig an BTLA-defiziente TZ war vergleichbar mit der Bindung des Fusionsproteins an wt TZ nach Blockade der BTLA Bindung mit den generierten spezifischen mAK. Durch Färbung mit anti-CD160 mAK nach TZ Stimulation konnte ebenfalls eine starke Expression von CD160 auf CD8<sup>+</sup> TZ aus BTLA-defizienten Mäusen detektiert werden, vergleichbar mit der Expression auf wt CD8<sup>+</sup> TZ. Auch auf CD4<sup>+</sup> TZ konnten diesbezüglich keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden (Abb. 30). Trotz alledem konnte in Abwesenheit von BTLA die negative Wirkung von HVEM auf beide TZ-Subpopulationen fast vollständig aufgehoben werden, was deutlich macht, dass gerade BTLA notwendig für die von HVEM vermittelte Inhibition war, und somit die vorhandene CD160 Expression den Ausfall von BTLA nicht kompensieren konnte.



**Abb. 30: Expression von CD160 nach Aktivierung von BTLA-defizienten T-Zellen.**

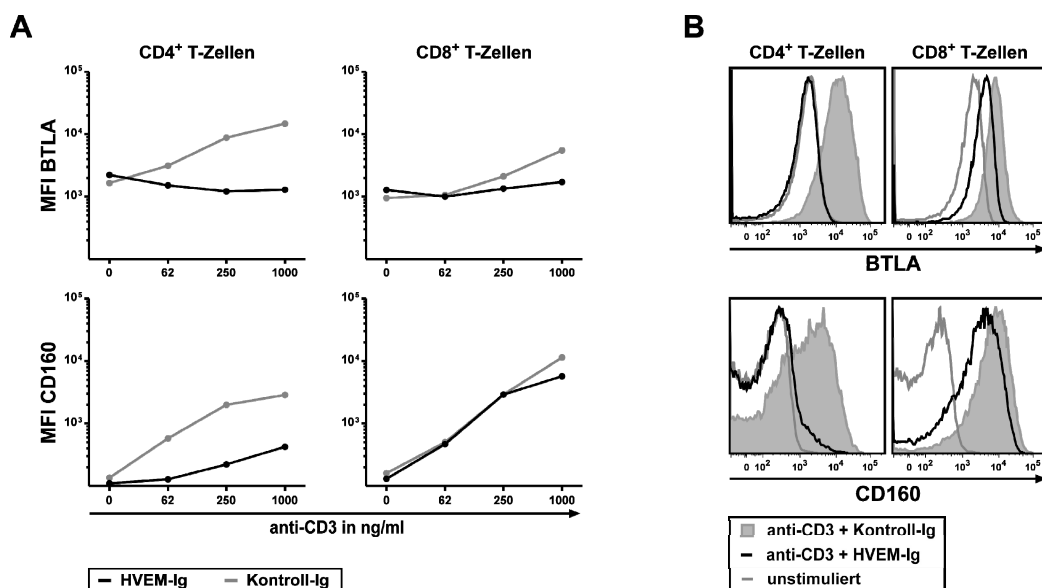
Vergleich der aktivierungsinduzierten CD160-Expression auf BTLA-defizienten T-Zellen (BTLA<sup>-/-</sup>) und T-Zellen aus wt Tieren (BTLA<sup>+/+</sup>). Durchflusszytometrische Analyse nach Stimulation der sortierten T-Zellen für 24 h mit 1000 ng/ml immobilisiertem anti-CD3 mAK. Die prozentualen Anteile der CD160-positiven Zellen bezogen auf die CD8<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T-Zellsubpopulation sind jeweils mit angegeben. Die Quadranten für die Analyse wurden an mit Isotyp-Kontrollantikörper gefärbten Zellen ausgerichtet (nicht gezeigt). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit sortierten T-Zellsubpopulationen erhalten.

Im Unterschied zu humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Cai *et al.*, 2008) bewirkte CD28 Kostimulation auf murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine deutliche Reduktion der CD160 Expression auf der Zelloberfläche, während in Anwesenheit des CD28 Signals verstärkt BTLA exprimiert wurde (Abb. 29). Diese Tatsache spricht erneut für eine übergeordnete Rolle von BTLA gerade bei

der HVEM vermittelten T-Zellsuppression in Gegenwart von zusätzlichen kostimulatorischen Signalen (Kapitel 3.4.3). Wenn auch ein Einfluss von CD160 nach HVEM Bindung nicht gänzlich auszuschließen ist, so erscheint er doch, verglichen mit Wirkung über BTLA, eher von untergeordneter Bedeutung. So lassen sich die verbliebenen minimalen Effekte von HVEM auf die T-Zellaktivierung und Proliferation in Abwesenheit von BTLA (Vgl. z.B. Proliferationskurven von BTLA-defizienten T-Zellen in Anwesenheit von HVEM, Abb. 26) eventuell auf diese Interaktion zurückführen.

### 3.4.6 Von HVEM vermittelte Signale supprimieren die aktivierungs-induzierte Expression der Rezeptoren BTLA und CD160

Nachdem BTLA und HVEM bereits im Ruhezustand auf T-Lymphozyten exprimiert waren und nach Aktivierung zudem auch CD160 auf den T-Zellen detektiert werden konnte, wurde auch die Expression dieser Moleküle nach T-Zellkostimulation mit HVEM-Ig untersucht. In Gegenwart des HVEM-Fusionsproteins wurde die BTLA-Expression auf der Zelloberfläche bei gleichzeitigem TZR-Stimulus nicht länger hochreguliert (Abb. 31). Da der für die BTLA-Färbung verwendete mAK unabhängig von HVEM und BTLA bindet (Kapitel 3.1.4.2), beruhte dies nicht auf der Blockade des BTLA-Epitopes durch das HVEM-Fusionsprotein.



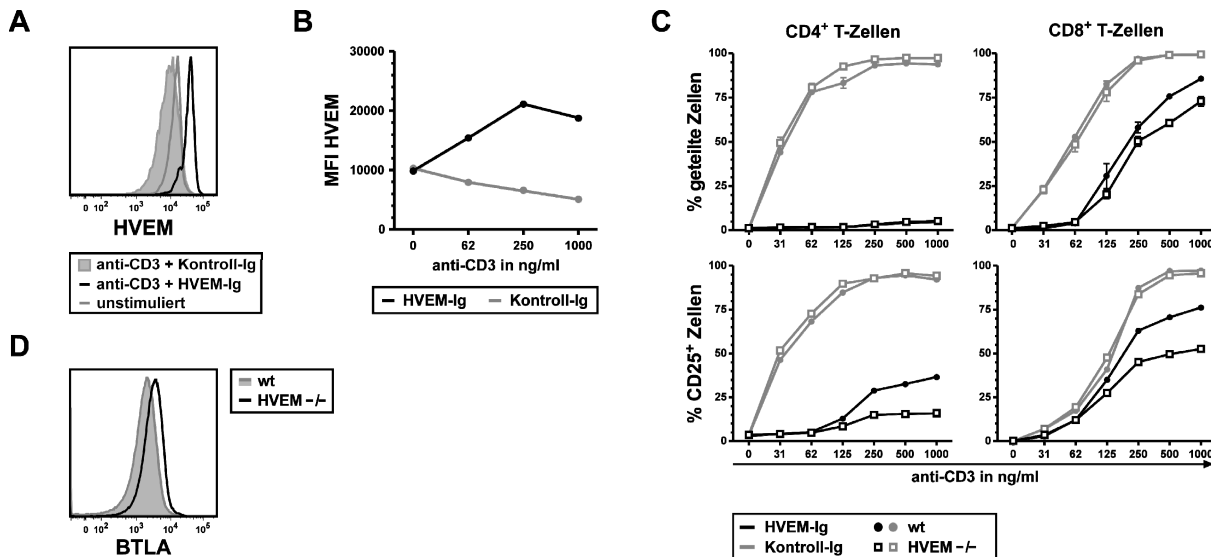
**Abb. 31: Expression von BTLA und CD160 nach Suppression der T-Zellaktivierung durch HVEM**

Vergleich des Einflusses der durch HVEM-induzierten Suppression auf die Expression von BTLA (obere Reihe) und CD160 (untere Reihe) auf den angegebenen T-Zellsubpopulationen. Durchflusszytometrische Analyse nach Stimulation der sortierten T-Zellen für 24 h mit immobilisiertem anti-CD3 mAK A) Expression von BTLA und CD160 in Abhängigkeit von der anti-CD3 Konzentration in Anwesenheit von HVEM-Ig (schwarze Graphen) oder Kontroll-Ig (graue Graphen). B) Es ist exemplarisch die Expression von BTLA und CD160 unter den angegebenen Bedingungen bei Stimulation mit 1000 ng/ml anti-CD3 mAK dargestellt.

Es war jedoch nicht klar, ob der beobachtete Effekt direkt durch die HVEM-Bindung an BTLA oder erst über Eingriffe in TZR Signalwege ausgelöst wurde, vergleichbar mit der Blockade von anderen Aktivierungsmarkern in Gegenwart von HVEM. Dass allein die Bindung von HVEM eine Verringerung von starker BTLA-Expression bewirken konnte, wurde bereits in Kapitel 3.4.3 für aktivierte T-Zellen nach Wegfall des TZR-Stimulus beschrieben. Allerdings wurde durch HVEM-Ig die Hochregulation von BTLA nur in CD4<sup>+</sup> TZ vollständig verhindert, wohingegen sich auf CD8<sup>+</sup> TZ eine geringe Induktion von BTLA nach Aktivierung beobachten ließ (Abb. 31 B). Wie ebenfalls in Abb. 31 dargestellt, war in Gegenwart von HVEM auch eine Reduktion der aktivierungsinduzierten CD160 Expression auf den T-Zellen festzustellen, obwohl der Einfluss von HVEM auf die CD160 Expression verglichen mit der Wirkung auf BTLA deutlich geringer ausfiel.

#### **3.4.7 Die Expression von HVEM auf der T-Zelle ist nicht essentiell für die T-Zellinhibition über BTLA**

Im Gegensatz zu der normalerweise beobachteten Herunterregulation von HVEM nach T-Zellaktivierung, konnte bei gleichzeitiger Stimulation mit anti-CD3 mAK und HVEM-Ig eine verstärkte HVEM-Expression auf den T-Zellen festgestellt werden (Abb. 32 A und B). Daraus resultierte die Frage, ob die hier beobachtete Heraufregulation der HVEM-Expression auf den T-Zellen wichtig für die Inhibition der TZ-Aktivierung war, und negative Signale durch Bindung von HVEM an BTLA auch zwischen den T-Zellen übermittelt werden konnten. Um den Einfluss von HVEM diesbezüglich zu untersuchen, wurden HVEM-defiziente T-Zellen in Gegenwart von HVEM-Ig stimuliert, und die von HVEM vermittelten Effekte auf T-Zellaktivierung und Proliferation mit denen auf wt T-Zellen verglichen (Abb. 32 C). Dabei konnte festgestellt werden, dass auch HVEM-defiziente T-Zellen deutlich über BTLA zu inhibieren waren und zwar keinesfalls geringer verglichen mit wt TZ. Somit war für die Suppression der T-Zellaktivierung über BTLA im verwendeten System keine HVEM-Expression auf T-Zellen erforderlich, und zusätzliche negative Signale von HVEM über BTLA durch Interaktion der T-Zellen untereinander nicht von Bedeutung. Die beobachtete stärkere Expression von HVEM auf den T-Zellen könnte ein Ergebnis der nicht erfolgten BTLA Heraufregulation sein. Bei einer T-Zellaktivierung ohne starke von HVEM vermittelte Signale würde so eine höhere BTLA-Expression die HVEM-Expression auf den T-Zellen limitieren, ähnlich wie für BTLA<sup>tg</sup> T-Zellen beschrieben (Kap. 3.3.2, Abb. 22 A).



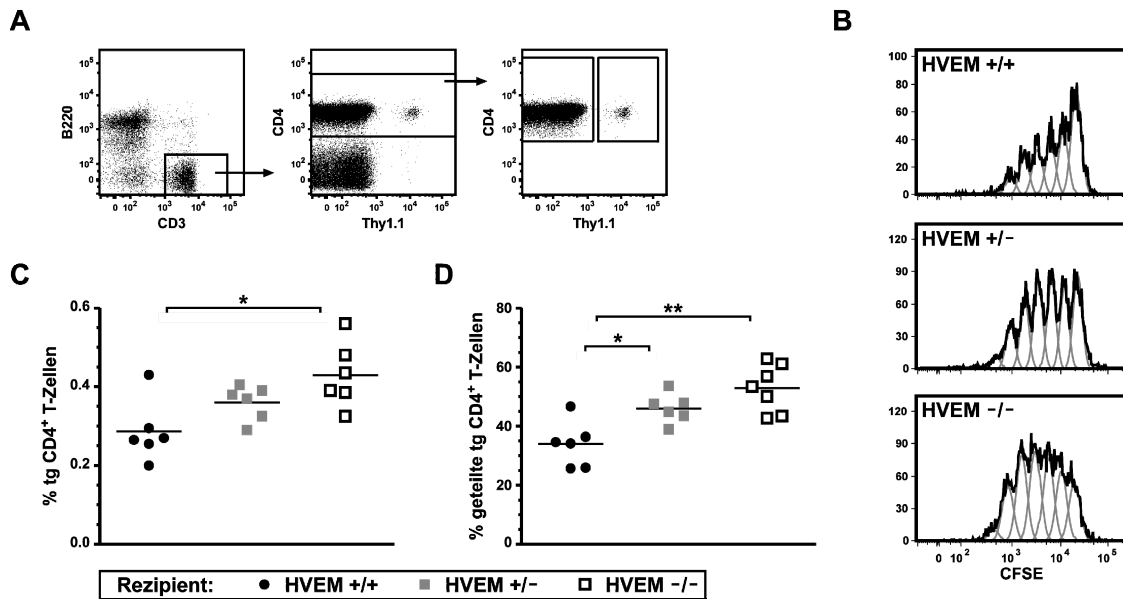
**Abb. 32: Relevanz der HVEM-Expression auf T-Zellen für die Suppression der T-Zellaktivierung**

Die sortierten T-Zellen wurden wie in Abb. 24 beschrieben stimuliert und durchflusszytometrisch analysiert. A) und B) Verstärkte Expression von HVEM auf T-Zellen nach Stimulation mit plattengebundenem anti-CD3 mAK in Anwesenheit von HVEM-Ig (schwarze Graphen). Dargestellt ist die Expression von HVEM unter den angegebenen Bedingungen auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 3 Tagen Stimulation mit 500 ng/ml anti-CD3 (A) bzw. in Abhängigkeit von der anti-CD3 mAK Konzentration (B). C) Suppression der Aktivierung von HVEM-defizienten T-Zellen (□) in Anwesenheit von HVEM-Ig (schwarz) oder Kontroll-Ig (grau) in Abhängigkeit von der anti-CD3 Konzentration. Dargestellt ist sowohl die Proliferation (obere Reihe) nach 66 h als auch der prozentuale Anteil CD25-positiver Zellen nach 20 h Aktivierung der entsprechenden T-Zellsubpopulationen. Zum Vergleich wurden parallel ebenfalls T-Zellen aus wt Tieren (●) stimuliert. D) Verstärkte BTLA-Expression auf isolierten T-Zellen aus HVEM-defizienten Tieren (schwarzes Histogramm) im Vergleich zu wt Tieren (grau ausgefülltes Histogramm).

Darüber hinaus konnte tatsächlich sogar eine etwas stärkere Inhibition der T-Zellaktivierung von HVEM-defizienten T-Zellen nach Kostimulation über BTLA festgestellt werden. Während der negative Einfluss von HVEM-Ig auf die Proliferation von CD8<sup>+</sup> TZ aus HVEM-defizienten Mäusen nur geringfügig stärker als bei wt TZ war, wurde die aktivierungsinduzierte Expression von CD25 durch Stimulation mit HVEM-Ig deutlich mehr auf HVEM-defizienten TZ supprimiert, als auf wt TZ. Wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben wurde, exprimieren HVEM-defiziente T-Zellen im Vergleich zu wt T-Zellen mehr BTLA auf der Oberfläche (Abb. 32 D). Die stärkere Inhibition dieser Zellen in Anwesenheit von HVEM-Ig zeigte somit erneut die Korrelation zwischen Expression und resultierender negativer Funktion von BTLA.

### 3.4.8 Das BTLA-HVEM System ist auch an der Suppression der T-Zellaktivierung *in vivo* beteiligt

Nach umfassender Analyse der negativen Wirkung von HVEM und BTLA auf die T-Zellstimulation *in vitro*, sollte geklärt werden, ob die negative Kostimulation dieses bisher isoliert betrachteten Systems auch *in vivo* unter komplexeren Bedingungen und in Anwesenheit verschiedener anderer Signalwege nachweisbar ist. Um den Einfluss des BTLA-HVEM Systems auf die T-Zellaktivierung *in vivo* zu überprüfen, wurden T-Zellen aus TZR-transgenen Mäusen nach adoptiven Transfer in syngene Rezipienten spezifisch über ihr Antigen aktiviert, wobei neben Wildtypmäusen, auch heterozygot und homozygot HVEM-defiziente Mäuse (HVEM<sup>+/-</sup> und HVEM<sup>-/-</sup>) als Empfängertiere verwendet wurden. Die Oberflächenexpression von HVEM auf den Zellen aus den HVEM<sup>+/-</sup> Tieren entsprach auch hier genau der Hälfte der eigentlichen wt Expression (nicht gezeigt). Damit konnte in einem physiologischen Kontext die Aktivierung der transferierten T-Zellen in Rezipienten mit unterschiedlicher HVEM-Expression untersucht werden. Dass neben der BTLA-Expression auf der T-Zelle auch die verfügbare HVEM-Menge in der Umgebung entscheidend für die Stärke der negativen T-Zellkostimulation über BTLA war, konnte bereits bei der *in vitro* T-Zellaktivierung beobachtet werden. Durch Verringerung der Menge an HVEM-Ig wurde auch der inhibitorische Effekt auf die T-Zellaktivierung reduziert (nicht gezeigt). Äquivalent dazu sollte auch die reduzierte Expression von HVEM auf den antigenpräsentierenden Zellen der HVEM-defizienten Rezipienten Auswirkungen auf die Menge der über BTLA vermittelten negativen Signale haben, und sich so auch auf die TZ-Aktivierung *in vivo* auswirken. Um Effekte auszuschließen, die durch HVEM-Expression auf anderen Donorzellen vermittelt werden könnten, wurden sortierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Milzen von OT-II Mäusen, die einen transgenen TZR spezifisch für ein Ovalbuminpeptid exprimieren, in die verschiedenen Rezipientenmäuse transferiert. Nachfolgend wurden die transferierten T-Zellen in den Mäusen durch Injektion von Ovalbumin aktiviert. Dabei konnten sowohl bei der Aktivierung allein mit Antigen (nicht gezeigt), als auch mit LPS als Adjuvans, nach drei Tagen deutliche Unterschiede bei der Proliferation der transferierten T-Zellen beobachtet werden (Abb. 33). Die in HVEM<sup>-/-</sup> Mäuse transferierten transgenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen proliferierten bei gleicher Antigenmenge deutlich stärker als die TZ in den wt Rezipienten, der Grad der Proliferation von transgenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den HVEM<sup>+/-</sup> Mäusen lag jeweils genau dazwischen. Dadurch waren sowohl prozentual (Abb. 33 B) als auch absolut (nicht gezeigt) mehr antigenspezifische T-Zellen in den HVEM-defizienten Rezipienten vorhanden.



**Abb. 33: Initiale Analyse der BTLA-HVEM Funktion *in vivo***

Adoptiver Transfer von  $3 \times 10^6$  sortierten und mit CFSE markierten TZR-transgenen  $CD4^+$  T-Zellen aus Milzen von OT-II Mäusen in syngene Rezipientenmäuse mit genetisch veränderter HVEM-Expression (Wildtypiere = HVEM+/+, heterozygot und homozygot HVEM-defiziente Mäuse = HVEM+/- bzw. HVEM-/-). Nach 24 h wurden die Rezipientenmäuse i.p. mit 15  $\mu$ g Ovalbumin und 3  $\mu$ g LPS als Adjuvans immunisiert (Tag 0). Die Zellen aus den Milzen der entsprechenden Mäuse wurden 66 h nach Immunisierung durchflusszytometrisch analysiert. A) Repräsentative Färbung zur Detektion der antigenspezifischen T-Zellen innerhalb der gesamten Milzzellen. Anhand des Thy-1.1 Markers lassen sich die transferierten von den endogenen  $CD4^+$  T-Zellen unterscheiden. B) bis D) Proliferation und Expansion der transferierten transgenen T-Zellen nach Aktivierung durch das Antigen. B) Repräsentative Proliferationsprofile transgener Zellen nach *in vivo* Aktivierung in den entsprechenden Rezipientenmäusen. Dargestellt sind weiterhin der prozentuale Anteil der transgenen  $CD4^+$  T-Zellen bezogen auf die Gesamtplenozyten (C) und die berechneten Anteile an geteilten transgenen Zellen (D) für Einzeltiere der entsprechenden Gruppen (n=6) nach Immunisierung. Dargestellt ist 1 von 2 vergleichbaren Experimenten. Gleiche Ergebnisse wurden auch nach Immunisierung ohne LPS als Adjuvans erhalten.

Diese Unterschiede wurden auch bei der Aktivierung der transferierten Zellen deutlich (nicht gezeigt). Grundsätzlich konnte also eine stärkere TZ-Aktivierung beobachtet werden, je weniger HVEM in der T-Zellumgebung vorhanden war. Die durch vollständigen Wegfall der HVEM-BTLA Interaktion verursachten Unterschiede zwischen der Aktivierung in wt und HVEM<sup>-/-</sup> Rezipienten spiegeln die negative Wirkung dieses Modulationssystem wider. Somit konnte gezeigt werden, dass selbst unter *in vivo* Bedingungen und unter Beteiligung weiterer kostimulatorischer Signale der Beitrag des BTLA-HVEM Systems sichtbar wurde, was für eine wesentliche Rolle von BTLA und HVEM bei der negativen Modulation der T-Zellaktivierung spricht.

## 4 Diskussion

Um eine effektive Immunantwort zu gewährleisten und gleichzeitig die Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen aufrechtzuerhalten, werden die verschiedenen Zellen des Immunsystems durch eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen reguliert, die synergistisch und teilweise redundant wirken. Zum besseren Verständnis der Regulationsmechanismen ist es daher notwendig, einzelne Komponenten dieses komplexen Netzwerkes zu untersuchen.

Die erst vor kurzem beschriebene Interaktion von BTLA, einem Oberflächenmolekül aus der Ig-Superfamilie mit HVEM, einem Mitglied der TNFR-Familie stellt nicht nur eine ungewöhnliche Verbindung dieser zwei strukturell verschiedenen Proteinfamilien dar, sie trägt auch funktionell zur Regulation von Zellantworten bei (Sedy *et al.*, 2005). Eine exakte Analyse der vermittelten Signale wird allerdings durch zusätzliche Interaktionspartner von HVEM erschwert, so ist ebenfalls eine Bindung von HVEM an LIGHT und CD160 beschrieben (Mauri *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 2008). Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag für das genauere Verständnis dieses speziellen Systems bezüglich der Interaktion zwischen BTLA und HVEM, zeigt aber auch verschiedene Aspekte der Komplexität auf, die allein diesem System zugrunde liegen.

Eine Analyse der BTLA-Funktion setzte eine exakte Kenntnis der Expression dieses Moleküls voraus. Aus diesem Grund war ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit die umfassende Charakterisierung von BTLA hinsichtlich der Expression im Maussystem. Um BTLA detektieren zu können, wurden in dieser Arbeit mit Hilfe unterschiedlicher Strategien verschiedene monoklonale Antikörper generiert, die spezifisch BTLA erkennen, was durch Analyse von Gewebe oder isolierten primären Zellen von BTLA-defizienten Tieren verifiziert wurde. Dabei wurden ebenfalls mAK erhalten, die die Bindung des BTLA-Liganden HVEM verhindern. Ob die Stärke dieser Blockade der HVEM-Bindung für eine Unterbrechung der Signalvermittlung über BTLA ausreichend ist, wird derzeit genauer analysiert. Weiterhin zeigten viele der mAK deutlich bessere Färbeeigenschaften in der Durchflusszytometrie als die meisten in der Literatur beschriebenen mAK (Sedy *et al.*, 2005), wodurch auch die Detektion sehr schwacher BTLA-Expressionen möglich war. Zudem konnten so erstmalig histologische Untersuchungen unterschiedlicher Gewebe durchgeführt werden, die Aufschluss über die Lokalisation BTLA-tragender Zellen geben. Die initiale Analyse der BTLA-Expression auf RNA-Ebene wurde so durch die Analyse auf Proteinebene ergänzt und weitergeführt. Mit den in dieser Arbeit generierten mAK wurde ausgehend von den gesamten

Gewebe auch die BTLA-Expression auf einzelnen Zellen bestimmt, und so eine umfassende Analyse der Proteinexpression von BTLA durchgeführt. Dadurch können, auch als Ausgangspunkt für weitere Arbeiten, in Kombination mit der Expression des Liganden HVEM potentielle Wirkungsorte und von BTLA regulierbare Zelltypen definiert werden, und damit auch immunologische Prozesse, die von diesem Rezeptor-Ligand-System beeinflusst werden können.

#### **4.1 Expressionsanalysen als Voraussetzung für die Untersuchung der Funktion**

Bei der Analyse der BTLA-Expression fiel als erster wichtiger Aspekt die Restriktion von BTLA auf die lymphatischen Gewebe auf (Abb. 11), was bereits als erster Anhaltspunkt für eine immunologisch relevante Funktion dieses Moleküls angesehen werden kann. Innerhalb der lymphatischen Gewebe ist BTLA allerdings auf beinahe allen Zellen konstitutiv vorhanden. Durchflusszytometrische Analysen der betreffenden Organe bestätigten dies, bereits im Ruhezustand exprimieren T-Zellen, B-Zellen, Dendritische Zellen, Makrophagen und NK-Zellen BTLA. Im Vergleich zu allen anderen Mitgliedern der CD28-Proteinfamilie ist BTLA somit deutlich weiter verbreitet exprimiert. Allerdings fielen erhebliche Unterschiede in den BTLA-Expressionsstärken zwischen den verschiedenen Zellpopulationen auf. Alle TZ-Populationen, auch  $\gamma\delta$ -T-Zellen und regulatorische T-Zellen, sowie NKT-Zellen und CD11b<sup>+</sup> DZ exprimieren in etwa gleiche Mengen BTLA, aber deutlich weniger verglichen mit B-Zellen und CD8<sup>+</sup> DZ (Abb. 12). In allen analysierten sekundärlymphatischen Organen konnte zumindest im Ruhezustand keine BTLA-Expression zwischen diesen zwei Expressionsniveaus detektiert werden. Die Ursache und funktionelle Relevanz dieser beiden unterschiedlichen Expressionsstärken ist bisher nicht bekannt. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden inzwischen ähnliche Ergebnisse publiziert (Han *et al.*, 2004; Sedy *et al.*, 2005), dennoch wurde gerade dieser grundlegende Aspekt der Expression weit weniger detailliert und umfangreich analysiert als in dieser Arbeit. So waren bisher besonders kleinere Populationen wie NK- und NKT-Zellen, aber auch die Subpopulationen der DZ nur unzureichend charakterisiert, andererseits fehlten auch genaue Expressionskinetiken, die für ein Gesamtbild der Expression und Funktion von BTLA erforderlich sind. Wie sich zeigte, wird BTLA trotz konstitutiver Expression auf verschiedenen Zellpopulationen zudem auch aktivierungsabhängig reguliert (Abb. 14). Zusammengenommen implizieren diese Ergebnisse eine potentielle Beteiligung von BTLA-Signalen an der Modulation verschiedener Zellpopulationen im Ruhezustand und bei Immunantworten. Die gleichzeitige Expression von



HVEM auf allen BTLA-tragenden Zellen (Abb. 12 und Kap.3.2) weist zudem auf eine gegenseitige Regulation verschiedener interagierender Zellen über diesen Signalweg hin. Ausgehend davon sollen nachfolgend diese verschiedenen Aspekte der Expression im Zusammenhang mit der Funktion von BTLA diskutiert werden. Trotz der im Vergleich zu B-Zellen und DZ (Abb. 12) eher geringen konstitutiven Expression von BTLA auf T-Zellen wurde die funktionelle Relevanz für diese Zellpopulation deutlich.

## **4.2 BTLA reguliert die T-Zellaktivierung**

Zeitgleich mit der Identifikation wurde BTLA als negativer TZ-Kostimulator beschrieben (Watanabe *et al.*, 2003). Ausgehend davon wurde in dieser Arbeit die Regulation der TZ-Aktivierung durch BTLA hinsichtlich verschiedener Aspekte genauer untersucht. Dazu wurden isolierte T-Zellen *in vitro* über den TZR stimuliert, was den Vorteil bietet, definierte Signale zusätzlich zum TZR analysieren zu können, als reduktionistischer Ansatz ohne zusätzliche unbekannte Parameter der Umgebung.

Im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen Hyperproliferation von T-Zellen in Abwesenheit von BTLA oder HVEM (Watanabe *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004) konnte in der vorliegenden Arbeit keine verstärkte Aktivierung von BTLA- oder HVEM-defizienten T-Zellen festgestellt werden. Wie Krieg *et al.* später zeigten, wurden die publizierten Unterschiede jedoch nicht durch den Verlust der BTLA-Signale bewirkt, sondern durch unterschiedliche Anteile von leichter zu aktivierenden T-Gedächtniszellen in den verwendeten Mäusen (Krieg *et al.*, 2007), was aber nicht der Fall in den untersuchten T-Zellen dieser Arbeit war. Die T-Zellen wurden jeweils aus 8-12 Wochen alten BTLA-defizienten oder heterozygot BTLA<sup>tg</sup> Mäusen isoliert, die keine diesbezügliche Veränderung zeigten (Abb. 18 und Abb. 20). Weder das Fehlen noch die Überexpression von BTLA veränderten die Aktivierung der T-Zellen über den TZR (Abb. 21), was zeigt, dass die BTLA-Expression an sich die Reaktivität von T-Zellen nicht beeinflusst.

Erst nach Interaktion mit dem Liganden wurde die kostimulatorische Funktion von BTLA ersichtlich. Schon bevor der Interaktionspartner von BTLA bekannt war, wurde die Inhibition der TZ-Antwort mit BTLA-spezifischen mAK gezeigt (Han *et al.*, 2004). Die negative Kostimulation durch BTLA Signale konnte in dieser Arbeit durch Bindung des natürlichen Liganden in Form von HVEM-Fusionsprotein reproduziert werden. In Gegenwart eines TZR-Stimulus wurden durch HVEM-vermittelte Signale sowohl die Proliferation der T-Zellen, als auch die Expression von aktivierungsinduzierten Oberflächenmolekülen stark blockiert

(Abb. 23). Wie für CTLA-4 und PD-1 beschrieben (Krummel und Allison, 1996; Carter *et al.*, 2002), so wird auch durch Kostimulation über BTLA die Expression der IL-2 Rezeptor  $\alpha$ -Kette (CD25) inhibiert, die für eine hochaffine Bindung von sezerniertem IL-2 notwendig ist (Cerdan *et al.*, 1995), und damit zur Zellproliferation beitragen würde. Verglichen mit der durch mAK beobachteten restriktiven Wirkung auf CD25 (Krieg *et al.*, 2005) war die durch HVEM-Ig ausgelöste Suppression der TZ-Aktivierung deutlich weitreichender. So wurden auch weitere Aktivierungsantigene der T-Zellen wie CD69 und die kostimulatorischen Moleküle ICOS, PD-1, PD-L1, OX40 und 4-1BB supprimiert (Abb. 23 B), was zeigt, dass über BTLA-Signale auch die weitere Modulation der TZ-Aktivierung verhindert wird. Im Gegensatz zu anderen negativen Kostimulatoren, die erst im Verlauf der Aktivierung induziert werden, ist durch die konstitutive Expression von BTLA auf T-Zellen bereits die Abbremsung der frühen TZ-Aktivierung durch Kontakt mit dem Partnermolekül möglich (Kap. 3.4.1). Während für PD-1 eine inhibitorische Wirkung erst zu späteren Zeitpunkten festgestellt wurde (Carter *et al.*, 2002), konnte die Blockade der TZ-Aktivierung über BTLA hingegen bereits 6 h nach Stimulationsbeginn beobachtet werden.

Interessanterweise gab es erhebliche Unterschiede zwischen der negativen Wirkung von HVEM-Ig auf die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TZ-Subpopulationen, die bereits bei der Stimulation über mAK auffielen, aber nicht näher untersucht wurden (Krieg *et al.*, 2005). Während die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch HVEM nahezu vollständig supprimiert wurde, konnten CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch in Gegenwart von HVEM noch substanziell über den TZR aktiviert werden (Abb. 24). Die im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen höhere BTLA Oberflächenexpression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowohl im Ruhezustand als auch nach Aktivierung (Abb. 17) war Ausgangspunkt für die Untersuchung der verschiedenen HVEM-Liganden auf den T-Zellen zur Beurteilung des individuellen Einflusses auf die durch HVEM vermittelte TZ-Suppression.

#### **4.2.1 Die BTLA-Expression bestimmt die Stärke der T-Zellsuppression**

Dabei wurde vor allem der Frage nachgegangen, ob die differenzielle Wirkung von HVEM auf die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TZ-Subpopulationen allein durch die unterschiedliche Oberflächenexpression von BTLA auf diesen Zellen bedingt wurde. Durch Vergleich der inhibitorischen Effekte auf die Aktivierung von T-Zellen mit verschiedenen BTLA-Expressionsstärken zeigte sich deutlich die Rolle der BTLA-Expression für die über HVEM vermittelte T-Zell-

suppression. Dabei wurden T-Zellen aus BTLA<sup>tg</sup>-Mäusen (auf denen BTLA überexprimiert wird) stärker durch HVEM inhibiert als T-Zellen aus wt Mäusen (Abb. 27), hingegen führte die Verringerung der BTLA-Expression bei T-Zellen aus heterozygot BTLA-defizienten Tieren zu schwächeren negativen Effekten (Abb. 26). Da durch eine erhöhte BTLA-Expression auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen vollständig inhibiert werden konnten, und dies auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Reduktion von BTLA nicht mehr möglich war, können zellinhärente Unterschiede zwischen den TZ-Subpopulationen als Ursache für die differenzielle HVEM-Wirkung weitgehend ausgeschlossen werden. Somit waren die beobachteten Unterschiede in der Suszeptibilität der beiden TZ-Subtypen gegenüber der von HVEM vermittelten Inhibition offensichtlich eine Folge der unterschiedlichen initialen BTLA-Oberflächenexpression auf diesen TZ-Subpopulationen. Ähnlich werden auch für andere kostimulatorische Moleküle, wie ICOS, 4-1BB und OX-40 präferenzielle Funktionen auf den TZ-Subpopulationen mit der stärkeren Expression beobachtet (Kap. 1.5). Es besteht demnach eine direkte Verbindung zwischen der Expressionsstärke und der negativen Funktion von BTLA. Dass die bestehende BTLA-Expression nach TZ-Aktivierung zusätzlich heraufreguliert wird, verdeutlicht die Notwendigkeit des BTLA-Signalweges für die T-Zelle. Dabei fiel bei verschiedenen experimentellen Ansätzen die strikte Korrelation dieser Regulation der BTLA-Expression mit der Aktivierungsstärke auf (Vgl. Abb. 22, Kap. 3.2.4.2), was demzufolge die Notwendigkeit der stärkeren Abbremsung einer stärker aktivierten Zelle über BTLA bedeuten würde. Entsprechendes würde auch für T-Gedächtniszellen gelten, die geringfügig mehr BTLA exprimieren als naive T-Zellen (Abb. 13). Zwar werden auch andere Interaktionspartner von HVEM auf T-Zellen exprimiert, dennoch konnte mit dieser Arbeit die entscheidende Rolle von BTLA für die T-Zellsuppression gezeigt werden.

#### **4.2.2 Potentielle Rolle anderer HVEM-Bindungspartner für die T-Zellsuppression**

Neben BTLA wurde auch für die TNF-Liganden LIGHT und LT $\alpha$  eine Interaktion mit HVEM beschrieben (Mauri *et al.*, 1998). Während LT $\alpha$  als sezerniertes Protein nicht für eine Signalübermittlung in die Zelle in Frage kommt, wird für LIGHT zumindest nach Bindung von DcR3 (Shi *et al.*, 2002; Wan *et al.*, 2002) eine intrazelluläre Signaltransduktion postuliert. Da jedoch auch die Aktivierung von LIGHT-defizienten T-Zellen durch HVEM inhibiert wurde (Abb. 28), erfolgt die von HVEM vermittelte TZ-Suppression nicht durch Bindung an LIGHT. Obwohl die LIGHT-Expression hier auf *in vitro* aktivierten T-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte, wurde die aktivierungsinduzierte Expression von LIGHT auf

T-Zellen in der Literatur von verschiedenen Gruppen gezeigt (Mauri *et al.*, 1998; Morel *et al.*, 2000). Dabei wird jedoch auch in Analogie zu anderen TNF-TNFR-Interaktionen davon ausgegangen, dass nach LIGHT-Bindung Signale über den Rezeptor HVEM induziert werden und nicht anders herum (Tamada *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2004), was auch erklärt, dass das Fehlen von LIGHT in diesem experimentellen Zusammenhang keine Auswirkung hat.

Inzwischen wurde auch die Bindung von HVEM an CD160 beschrieben, wobei CD160-Signale an der Inhibition humaner T-Zellen beteiligt sein sollen (Cai *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurden erstmalig die Beiträge von BTLA und CD160 an der von HVEM vermittelten TZ-Suppression miteinander verglichen. Da für eine genauere Analyse der Funktion von CD160 weder CD160-defiziente Zellen noch spezifische blockierende mAK zur Verfügung stehen, kann hier nur indirekt über die Expression auf die Relevanz dieses HVEM-Partners geschlossen werden. Bei dem Vergleich der Expression von BTLA und CD160 fiel interessanterweise eine unterschiedliche Verteilung der beiden Moleküle zwischen den TZ-Subpopulationen auf. Zwar werden sowohl CD160 als auch BTLA nach TZ-Aktivierung auf beiden Subpopulationen exprimiert, während CD4<sup>+</sup> T-Zellen jedoch im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen mehr BTLA exprimieren, konnte auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine erheblich stärkere Induktion der CD160-Expression beobachtet werden (Abb. 29). Die stärkere CD160-Expression auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde bereits für *in vitro* stimulierte Splenozyten berichtet, jedoch nicht genauer untersucht (Maeda *et al.*, 2005; Tsujimura *et al.*, 2006). Allerdings waren starke negative Effekte durch HVEM letztendlich nur auf den T-Zellen festzustellen, die mehr BTLA exprimierten (CD4<sup>+</sup>) und nicht auf den Zellen mit mehr CD160-Expression (CD8<sup>+</sup>). Dass BTLA für die HVEM-vermittelte TZ-Suppression essentiell ist, wurde deutlich, da allein durch das Fehlen von BTLA auf den T-Zellen die negative Wirkung von HVEM auf die TZ-Aktivierung beinahe vollständig aufgehoben wurde (Abb. 26). Die CD160-Expression war auch in BTLA-defizienten Zellen vorhanden (Abb. 30), konnte den Verlust von BTLA aber keineswegs ausgleichen.

Die minimale restliche Inhibition der TZ-Proliferation auch in BTLA-defizienten T-Zellen (Abb. 26 C), könnte als Beitrag weiterer HVEM-Liganden gewertet werden. Weiterhin wurde in BTLA-defizienten T-Zellen nach Stimulation über den TZR in Gegenwart von HVEM-Fusionsprotein die verstärkte Expression von PD-1 beobachtet (nicht gezeigt). Dieser Effekt wurde in abgeschwächter Form zu späteren Zeitpunkten auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt, wenn BTLA vorhanden war. Ob dies durch Interaktion mit CD160 ausgelöst wird, das auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Aktivierung deutlich exprimiert und durch HVEM weniger inhibiert wird als BTLA, ist nicht klar. Da die CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch HVEM nicht vollständig inhibiert

werden, scheint jedoch die Notwendigkeit anderer Mechanismen gegeben, wie die Induktion anderer negativer Regulatoren, die im Kontakt mit kostimulatorischen Liganden auf APZ die Aktivierung weiter abbremsen können. Genügend negative Signale durch HVEM-Bindung in Anwesenheit von BTLA, wie auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen, scheinen dies nicht erforderlich zu machen. Ob die hier beschriebenen Effekte auch unter physiologischen Bedingungen relevant sind, erfordert genauere Untersuchungen. Ähnliche Befunde mit BTLA-defizienten T-Zellen im Kontext einer Alloreaktion *in vivo* weisen jedoch darauf hin (Tao *et al.*, 2005).

Die Suppression der bei TZ-Aktivierung induzierten Oberflächenmarker, wie CD25, CD69 und ICOS durch HVEM war hingegen deutlich von BTLA abhängig, da die Expression dieser Moleküle in Abwesenheit von BTLA nicht mehr gehemmt wurde, hier also potentielle Signale anderer HVEM-Interaktionspartner keine Rolle spielen.

#### **4.2.3 Funktionelle Relevanz des negativen BTLA-Signals in der Immunantwort**

Obwohl, wie auch von anderen beschrieben, die durch HVEM vermittelte Inhibition in Gegenwart von CD28-Kostimulation schwächer ist, als bei Stimulation allein über den TZR (Han *et al.*, 2004; Krieg *et al.*, 2005; Sedy *et al.*, 2005), so lassen die dennoch vorhandenen Effekte in Anwesenheit eines sehr starken positiven Signals die Stärke der negativen Wirkung von BTLA erkennen (Abb. 25 A). Dass auch eine bereits bestehende Aktivierung durch die HVEM-BTLA-Interaktion supprimiert werden kann, verdeutlicht dies (Kap. 3.4.3). Der negative Beitrag von BTLA während der TZ-Aktivierung wurde in der vorliegenden Arbeit auch *in vivo*, innerhalb des komplexen Systems der TZ-Kostimulation, auch unter Beteiligung verschiedenster anderer Signalwege (besonders im Kontext eines LPS-Stimulus) gezeigt. Dabei konnte durch Reduktion der Signale von HVEM die TZ-Aktivierung verstärkt werden (Abb. 33), was die Kontrolle der TZ-Antwort durch negative Signale über BTLA verdeutlicht. Zwar kann die Beteiligung weiterer Signale an den durch HVEM vermittelten Effekten *in vivo* nicht vollständig ausgeschlossen werden, dennoch weisen gerade die Ergebnisse der Stimulation isolierter T-Zellen und auch die unterschiedlichen Expressionen der HVEM-Partner auf den T-Zellen auf eine entscheidende Rolle von BTLA hin. Wie in Abb. 29 B gezeigt, wird durch CD28-Kostimulation die BTLA Expression auf T-Zellen stark heraufreguliert, während CD160 deutlich unterdrückt wird. Entsprechend führte auch die Anwesenheit von Adjuvans zusätzlich zum Antigen nach Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen *in vivo* zu dem beschriebenen Verhalten der beiden Moleküle (nicht gezeigt). Somit

steht BTLA als Interaktionspartner für HVEM in Anwesenheit von weiteren kostimulatorischen Signalen deutlich mehr zur Verfügung als CD160.

Die negative Funktion von BTLA hängt jedoch von der gleichzeitigen HVEM Expression auf benachbarten Zellen ab, so dass z.B. in Gegenwart von APZ durch Kontakt mit HVEM Signale über BTLA vermittelt werden, die zur Terminierung der TZ-Aktivierung beitragen, und somit auch weitere Effektorfunktionen unterdrücken können. Es ist nicht geklärt, ob auch HVEM-Signale *in trans* zum TZR-Signal möglich sind, so dass von Zellen in der Umgebung negative Signale vermittelt werden, während die T-Zellen in Kontakt mit einer anderen Zelle durch Antigenpräsentation aktiviert werden. In einem Herztransplantationsmodell wurde jedoch gezeigt, dass HVEM auf regulatorischen T-Zellen für die Suppression der TZ-Aktivierung erforderlich ist (Tao *et al.*, 2008), was für diese Annahme spricht. Allerdings ist HVEM auf allen T-Zellen exprimiert (Abb. 17). Diese HVEM-Expression auf den T-Zellen selbst war jedoch für die TZ-Suppression nicht erforderlich, wie die Stimulation HVEM-defizienter T-Zellen zeigte (Abb. 32 C). Dadurch kann in diesem Fall eine zusätzliche negative Regulation über T-T-Interaktionen durch den BTLA-HVEM-Kontakt ausgeschlossen werden, die vereinzelt angenommen wird (Sedy *et al.*, 2005). Dass HVEM-defiziente T-Zellen eher stärker inhibiert wurden, unterstützt wiederum die Bedeutung der BTLA-Expression für die TZ-Suppression. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, exprimieren T-Zellen in Abwesenheit von HVEM mehr BTLA und infolgedessen können mehr negative Signale durch HVEM-Bindung übermittelt werden (Abb. 32 D). Funktionell ergibt sich damit weiterhin der interessante Aspekt einer gegenseitigen Regulation der Interaktionspartner.

### 4.3 Gegenseitige Regulation von BTLA und HVEM

Bereits im Ruhezustand fällt die inverse Expression von BTLA und HVEM auf vielen Zellpopulationen auf, so exprimieren T-Zellen zwar viel BTLA, dafür aber nur wenig HVEM, B-Zellen hingegen wenig BTLA und viel HVEM (Abb. 12 B). Verglichen mit den CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwar mehr BTLA, aber weniger HVEM. Dies kann entsprechend auch nach TZ-Aktivierung beobachtet werden, während BTLA verstärkt exprimiert wird, sinkt die HVEM Expression auf den T-Zellen (Abb. 17). Durch Blockade der BTLA-Induktion in Gegenwart des HVEM-Fusionsproteins, wird auch die Herunterregulation von HVEM verhindert (Abb. 31), was nicht nur auf die Inhibition der TZR-Signale zurückgeführt werden kann, da zumindest die Regulation der BTLA-Expression durch HVEM auch ohne Aktivierung stattfindet (Abb. 25 D). Eine gegenseitige Modulation der Moleküle wird besonders durch Analyse der defizienten Mäuse impliziert, wo jeweils das Fehlen des

einen Moleküls zur verstärkten Expression des Partnermoleküls führt (Abb. 22), was für BTLA-defiziente Mäuse zwar beschrieben, aber nicht genauer untersucht wurde (Sedy *et al.*, 2005). Da die durch TZ-Aktivierung induzierte Herunterregulation von HVEM teilweise auch über Blockade der LIGHT-Bindung verhindert wird, wurde ursprünglich angenommen, dass die über LIGHT vermittelten Signale die Regulation der HVEM-Expression bedingen (Morel *et al.*, 2000). Allerdings scheint LIGHT allein nicht ausreichend, da die Überexpression von LIGHT auf T-Zellen keine Änderung der HVEM-Expression bewirkt (Shaikh *et al.*, 2001), wohingegen durch verstärkte Expression von BTLA auf BTLA<sup>tg</sup> T-Zellen auch HVEM deutlich geringer exprimiert wurde (Abb. 22 A). Die aktivierungsinduzierte Regulation beider Moleküle ist dabei offensichtlich Teil des TZR-vermittelten Aktivierungsprogramms der Zelle, und geschieht auch in Abwesenheit des Interaktionspartners (Abb. 22 B). Allerdings begrenzt HVEM die BTLA Expression und umgekehrt, wofür allein der Kontakt zwischen verschiedenen Zellen ausreicht (Daten von S. Worbs, RKI). Damit kann während einer Zellinteraktion fortwährend die Regulation des Partnermoleküls erfolgen, um die erforderliche Signalgebung sicherzustellen und unnötige Signale zu verhindern.

Dabei stellt sich jedoch auch die Frage, inwieweit jede dieser Interaktion zu funktionellen Signalen über BTLA führen kann, da wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, die von HVEM-vermittelte Inhibition der TZ-Aktivierung von simultanen TZR-Signalen abhängig ist (Abb. 25). Somit würden nur negative Signale vermittelt werden, wenn die T-Zelle im Kontakt mit Antigen aktiviert wird. Auch in Abwesenheit von Fremdanthen werden den T-Zellen in der Peripherie fortwährend Autoantigene auf körpereigenen MHC-Molekülen präsentiert, durch deren Erkennung TZR-Signale vermittelt werden, die auch dazu beitragen die Sensitivität der T-Zelle im Kontext einer Immunreaktion zu beeinflussen (Stefanova *et al.*, 2002). Um dabei die vollständige Aktivierung der T-Zellen durch diese „Selbst“-Erkennung zu verhindern, könnten unterschiedliche negative Regulationsmechanismen, und damit auch BTLA eine Rolle spielen.

#### **4.4 Bedeutung von BTLA für Homöostase und Überleben**

Die konstitutive Expression von BTLA und HVEM im lymphatischen System führte zur Frage nach der funktionellen Bedeutung der Interaktion beider Moleküle im Ruhezustand des Organismus. Die Analyse der bezüglich BTLA-HVEM genetisch veränderten Mäuse zeigte besonders Einflüsse von BTLA auf die TZ-Subpopulationen. In BTLA-defizienten Mäusen fielen Unterschiede im Verhältnis zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen der sekundär-

lymphatischen Organe auf, so dass bei unveränderter Gesamt-T-Zellzahl weniger CD8<sup>+</sup> und gleichzeitig mehr CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden waren (Abb. 18 D). Ein entsprechender Unterschied wurde auch in HVEM-defizienten Mäusen beobachtet (nicht gezeigt), was die Auswirkung des fehlenden Signalwegs verdeutlicht. Daneben wurden in jüngeren Tieren keine weiteren Auffälligkeiten beobachtet, sowohl die B-Zellzahlen als auch die Anteile an Gedächtniszellen innerhalb der TZ-Subpopulationen waren unverändert. Die in der Literatur beschriebene Vermehrung von CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in Abwesenheit von BTLA konnte bei den hier verwendeten Tieren erst mit zunehmendem Alter beobachtet werden (Abb. 18 C, D). Als Ursache dafür wird die Rolle von negativen BTLA-Signalen für die Regulation der Homöostase von T-Zellen und des Überlebens von Gedächtniszellen, besonders für die CD8<sup>+</sup> T-Zellen diskutiert (Krieg *et al.*, 2007). In Übereinstimmung damit führte die Überexpression von BTLA auf T-Zellen in den BTLAtg Mäusen zu einer Verringerung der T-Zellzahl, die besonders in homozygot BTLAtg Tieren zu beobachten war (Abb. 19), wobei leicht stärkere Effekte auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen festzustellen waren, was auch in den heterozygoten Tieren zu einem verringerten Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen an den verbleibenden T-Zellen führte. Weiterhin wurden auch hier Unterschiede der BTLA-Wirkung zwischen naiven und T-Gedächtniszellen deutlich, die jedoch eher durch Unterschiede in der BTLA-Expression zwischen den einzelnen Subpopulationen zu erklären sind, als mit einer differenziellen BTLA-Wirkung. Im Gegensatz zu T-Zellen aus wt Mäusen, war in BTLAtg Mäusen BTLA stärker auf den naiven T-Zellen exprimiert (nicht gezeigt). Daher wurde hier die BTLA Wirkung auf naive T-Zellen am deutlichsten sichtbar, deren absolute Zellzahl durch verstärkte BTLA-Expression etwa 10-fach reduziert war, wohingegen die Gedächtniszellen maximal 5-fach verringert waren, und die Zahl der *Central Memory* CD8<sup>+</sup> T-Zellen sogar unverändert blieb (Abb. 20).

Es fiel auf, dass die beobachteten Effekte durch Änderung der BTLA-Expression nur T-Zellen betrafen, was für die BTLAtg Mäuse nicht verwunderlich ist, da das Transgen nur auf T-Zellen exprimiert wird. Die vergleichsweise geringe Auswirkung auf die B-Zellen (weniger als 2-fach reduzierte Zellzahl, Abb. 19 B) in diesen Tieren ist somit eher als sekundärer Effekt anzusehen, der nicht direkt über BTLA-Signale ausgelöst worden sein kann. Inwieweit hier der Kontakt mit T-Zellen, die mehr BTLA exprimieren, aber auch weniger HVEM, eine Rolle spielt, wird derzeit genauer untersucht. Allerdings wurden durch das Fehlen von BTLA offensichtlich andere Zelltypen deutlich weniger beeinflusst als T-Zellen, obwohl gerade B-Zellen im Ruhezustand deutlich mehr BTLA exprimieren. Inwieweit hier Mechanismen existieren, die über andere Signale einen Ausgleich für diesen Signalweg schaffen, ist nicht bekannt.



## 4.5 BTLA-Funktion im komplexen Immungeschehen

Trotz der im Gegensatz zu anderen negativen Oberflächenrezeptoren wie PD-1 und CTLA-4 massiven Expression von BTLA, aber auch HVEM, konnten auch von anderen Arbeitsgruppen nur geringe Effekte in Abwesenheit dieses Systems festgestellt werden. CTLA-4-defiziente Mäuse zeigen deutlich lymphoproliferative Funktionsstörungen, die zum Sterben der Tiere bereits wenige Wochen nach der Geburt führen (Waterhouse *et al.*, 1995). In BTLA-defizienten Mäusen hingegen wurden lediglich eine diskret erhöhte Anfälligkeit für die Peptid-induzierte experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE), sowie eine länger anhaltende allergische Atemwegsinfektion beobachtet (Watanabe *et al.*, 2003; Deppong *et al.*, 2006). Ähnliche Ergebnisse mit HVEM-defizienten Mäusen bei Peptid-induzierter EAE und auch Concanavalin A vermittelter T-Zell-abhängiger Autoimmunhepatitis (Wang *et al.*, 2005) bestätigen jedoch die negative Funktion des BTLA-HVEM Signalweges in diesen Systemen. Kürzlich wurde beschrieben, dass ältere BTLA-defiziente Mäuse eine Hepatitis-ähnliche Autoimmunerkrankung entwickeln, die zu einem reduzierten Überleben dieser Mäuse führen soll (Oya *et al.*, 2008). Auch in PD-1-defizienten Mäusen wurden verschiedene Autoimmundefekte beschrieben (Nishimura *et al.*, 1999; Nishimura *et al.*, 2001), was die Notwendigkeit für die negative Regulation der Immunantwort über diese beiden Moleküle deutlich macht. Diverse Untersuchung der letzten Jahre in Bezug auf Autoimmunerkrankungen im Menschen zeigten bisher zwar keine Assoziation von BTLA mit SLE und Typ-1 Diabetes (Inuo *et al.*, 2009), jedoch zu Rheumatoider Arthritis (Lin *et al.*, 2006). Die eher geringen oder auch erst später auftretenden Auswirkungen der Abwesenheit von BTLA-Signalen in den beschriebenen Systemen lassen eine gewisse Redundanz mit anderen Signalwegen vermuten, die in einem bestimmten Umfang das Fehlen einzelner Signale ausgleichen und so zum Entstehen einer neuen Balance beitragen können. Durch Akkumulation von verschiedenen Effekten im Laufe der Entwicklung wird der Phänotyp durch den Verlust der negativen Regulation über BTLA so erst später sichtbar. Allerdings geben verschiedene *in vivo* Modelle Hinweise auf eine weitere Funktion von BTLA. So verzögerte sich in BTLA-defizienten Mäusen bei Herztransplantationsexperimenten unter starker Aktivierung bei vollständiger MHC-Inkompatibilität die Abstoßung des Transplantats (Tao *et al.*, 2005), was auch für LIGHT-defiziente Mäuse gezeigt wurde (Ye *et al.*, 2002). Im Modell der akuten *Graft-versus-Host-Disease* konnte beobachtet werden, dass BTLA auch eine positive Rolle für das Überleben von T-Zellen hat (Hurchla *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang wird die Möglichkeit weiterer BTLA-Signalwege diskutiert, die über intrazelluläre Motive ähnlich zu positiven Kostimulatoren wie CD28 (Kap. 1.2) aktiviert werden könnten. Auch TZ-

Stimulationen mit eigenen anti-BTLA mAK führten in der frühen Phase zu verstärkter Aktivierung bevor eine Inhibition beobachtet wurde (nicht gezeigt), was für Stimulation mit HVEM-Ig nicht der Fall war. Vollständig unbeachtet blieb bisher die Bedeutung der BTLA-HVEM-Interaktion während Infektionen, obwohl in der Literatur die potentielle Modulation des BTLA-HVEM-Signalweges durch virale Erreger, wie HSV-1 und das humane Cytomegalievirus (CMV) beschrieben wurde (Cheung *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2005). Der Eingriff in den BTLA-HVEM-Signalweg als eine Strategie des Virusüberlebens um der Bekämpfung durch das Immunsystem entgegen zu wirken, würde erneut die Relevanz dieses Systems für die Immunantwort hervorheben.

Durch die beschriebene gegenseitige Modulation von BTLA und HVEM (Kap. 4.3) wird jedoch die genaue Beurteilung der beschriebenen und auch publizierten Ergebnisse erschwert, da Überexpression oder Fehlen von BTLA oder HVEM die gleichzeitige Verstärkung oder Abschwächung anderer Signalwege bedingen könnte.

#### **4.6 Weitere Signale zusätzlich zum negativen BTLA-Signal**

Durch zusätzliche Bindungspartner neben HVEM und BTLA ist ein System gegeben, das besonders durch die unterschiedlichen Interaktionen über vielfältige Signale auch zur wechselseitigen Regulation von miteinander interagierenden Zellen beitragen kann. Dabei kann HVEM nach Bindung von LIGHT als positiver Kostimulator fungieren, was vor allem durch verstärkte TZ-Aktivierung durch lösliches LIGHT gezeigt wurde (Harrop *et al.*, 1998; Sedy *et al.*, 2005; Tamada *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2004). Weiterhin wird durch LIGHT-Bindung an HVEM die Aktivierung von B-Zellen, Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen verstärkt, auch die Induktion der DZ-Maturierung über diese Interaktion wurde beschrieben (Duhon *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2006). Während durch LIGHT positive Signale für die Zelle über HVEM vermittelt werden, führt die Bindung von HVEM an BTLA zu inhibitorischen Signalen, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Dabei ist die Interaktion zwischen BTLA und HVEM nicht nur außergewöhnlich, da die Moleküle strukturell verschiedenen Familien angehören, sie komplettiert auch das Potential dieses Modulationssystems durch zusätzliche Möglichkeiten der Signalvermittlung auf diversen beteiligten Zellen. Die Funktion von BTLA auf anderen Zelltypen außer den T-Zellen wurde bisher allerdings kaum untersucht. Dabei ist BTLA wie bereits beschrieben auf vielen anderen Zellen exprimiert, und teilweise sogar deutlich stärker als auf T-Zellen (Abb. 12). Zwar wird eine Rolle von BTLA-Signalen für die Homöostase von bestimmten DZ-Subtypen angenommen, allerdings ist auch hier die Beteiligung weiterer Signalwege nicht abschließend

geklärt (DeTrez *et al.*, 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass über BTLA auch ein inhibitorischer Eingriff in den B-Zellrezeptorsignalweg möglich ist (Vendel *et al.*, 2009), was auch für PD-1 beschrieben wurde (Okazaki *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit gezeigte differenzielle Regulation der BTLA-Oberflächenexpression je nach B-Zellstimulus (Abb. 14 A) führt demnach zu der Annahme, dass negative Signale über BTLA während der verschiedenen Prozesse der B-Zellaktivierung unterschiedlich benötigt werden. Die in der Literatur beschriebenen widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der BTLA-Expression nach B-Zellaktivierung (Han *et al.*, 2004; Sedy *et al.*, 2005) sind auf unterschiedliche Stimulationsbedingungen und Analysezeitpunkte zurückzuführen.

Nachdem durch Bindung von HVEM Signale über BTLA vermittelt werden, und HVEM ebenfalls als Rezeptor fungiert, stellt sich die Frage, ob umgekehrt auch eine Signalgebung von BTLA über HVEM möglich ist. Es wird angenommen, dass TNF-Rezeptoren nach Bindung ihrer trimeren Liganden ebenfalls trimerisieren, wie für TNFR1 und LT $\alpha$  beschrieben, und diese Trimerisierung für die intrazelluläre Signaltransduktion über die TNF-Rezeptoren notwendig ist (Banner *et al.*, 1993; Bodmer *et al.*, 2002). Eine Trimerisierung von HVEM durch Bindung von BTLA findet vermutlich nicht statt, in den untersuchten HVEM-BTLA-Komplexen liegen sowohl HVEM als auch BTLA als Monomere vor (Compaan *et al.*, 2005). In Übereinstimmung damit konnte zwar in Gegenwart von antigenpräsentierenden Transfektanten, die HVEM exprimieren, eine Reduktion der TZ-Proliferation beobachtet werden (negative Signale über BTLA), hingegen wurde durch BTLA-Expression auf diesen Zellen die *in vitro* TZ-Aktivierung nicht beeinflusst (keine Signale über HVEM, Sedy *et al.*, 2005). Die funktionelle Notwendigkeit der BTLA-Signale für die Regulation der TZ-Aktivierung über HVEM trotz CD160-Expression wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Neben der Inhibition humaner T-Zellen (Cai *et al.*, 2008), allerdings durch anti-CD160 mAK, wurden bisher je nach Stimulationsbedingungen und verwendeten Reagenzien für T-, NK- und NKT-Zellen *in vitro* sowohl positive Funktionen von CD160 angenommen (Agrawal *et al.*, 1999; Le *et al.*, 2002; Rabot *et al.*, 2007), als auch negative Effekte beobachtet (Maeda *et al.*, 2005). Inwieweit durch HVEM-Bindung für murine T-Zellen tatsächlich funktionelle Signale über CD160 vermittelt werden, bleibt unklar. Für naive T-Zellen, B-Zellen und Dendritische Zellen kann allein aufgrund der vorhandenen Expression nur BTLA als HVEM-Rezeptor fungieren. Die Expression von HVEM ist jedoch nicht auf die lymphatischen Gewebe beschränkt, wodurch auch die Möglichkeit zur Modulation von Zellen in der Peripherie durch HVEM gegeben ist. Aktivierte BTLA-exprimierende Lymphozyten, die im Fall einer Inflammation/Infektion auch in peripheren Geweben vorhanden sind

(Abb. 11 D), könnten so durch Kontakt mit HVEM moduliert werden. Eine außergewöhnlich starke Expression von HVEM war in den Geweben zu beobachten, die aufgrund ihrer physiologischen Funktion ständig Pathogenen aus der Umwelt ausgesetzt sind, dem Darm und der Lunge (Ergebnisse S. Worbs, RKI). Eine negative Regulation der Immunantwort in diesen Geweben ist von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen aus der Umgebung. Die Rolle von HVEM für die Regulation der Immunreaktion im Darm zeigte sich durch die erhöhte Sensitivität von HVEM-defizienten Mäusen gegenüber einer durch Zelltransfer induzierten Colitis (Steinberg *et al.*, 2008). Da sich durch BTLA-defiziente T-Zellen dieser Phänotyp jedoch nicht reproduzieren ließ, könnten hier andere Interaktionen beteiligt sein. Besonders auf darmassoziierten T-Lymphozyten ist im Gegensatz zu T-Zellen der sekundärlymphatischen Organe kaum BTLA-Expression vorhanden (nicht gezeigt), die histologisch nachgewiesenen BTLA-tragenden Zellen aus dem Darm (Abb. 11 C) sind hauptsächlich B-Zellen und einige CD4<sup>+</sup> Lamina propria Lymphozyten. Dagegen wird CD160 im Darm sehr stark auf intraepithelialen Lymphozyten exprimiert (nicht gezeigt, (Anumanthan *et al.*, 1998; Tsujimura *et al.*, 2006). Somit könnte CD160 eine Rolle für die Regulation der T-Zellen im Darm über HVEM Interaktion spielen.

Inwieweit unter verschiedenen Bedingungen gerade *in vivo* durch die Interaktionspartner von HVEM kooperative Wirkungen anzunehmen sind, ist unklar, jedoch zeigen strukturelle Analysen, dass die Möglichkeit der gleichzeitigen Bindung von BTLA bzw. CD160 und LIGHT/LT $\alpha$  an HVEM besteht, da beide TNF-Liganden an andere Domänen von HVEM binden als die Interaktionspartner aus der Ig-Familie (Cheung *et al.*, 2005; Compaan *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2005; Sedy *et al.*, 2005). Weitere Untersuchungen ergaben, dass in Gegenwart von LIGHT sowohl eine stärkere Bindung von BTLA als auch CD160 an HVEM stattfindet, was zur Verstärkung potentieller Signale beitragen könnte. Diese Analysen weisen auch auf eine im Vergleich zu CD160 höhere Affinität zwischen BTLA und HVEM hin (Cheung *et al.*, 2005; Compaan *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2008). Allerdings wurde durch die Kristallstruktur des Komplexes aus humanem BTLA und HVEM auch deutlich, dass eine Interaktion zwischen diesen beiden Molekülen nicht nur auf benachbarten Zellen, sondern auch auf ein und derselben Zelle möglich wäre. Ob diese Interaktion auf einer Zelle tatsächlich stattfindet ist genauso wenig geklärt wie die Frage, ob ein trimolekularer Komplex von membrangebundenen BTLA/CD160, HVEM und LIGHT auch *in vivo* bei Zellinteraktionen gebildet wird.

Aufgrund der verbreiteten Expression sowohl von BTLA, HVEM aber auch LIGHT kann jedoch durch die oben beschriebenen Signale die Funktionalität von verschiedenen an der Immunantwort beteiligten Zellen reguliert werden. Das bedeutet umgekehrt allerdings auch, dass jede Interaktion zwischen Zellen ebenso von anderen Bindungspartnern dieses Systems maßgeblich bestimmt wird, und durch die gleichzeitige Expression von Rezeptor und Ligand auf den gleichen Zellen unterschiedliche Signale in beide Richtungen zur wechselseitigen Regulation der Zellen beitragen. So können z.B. durch den Kontakt von Dendritischen Zellen mit T-Zellen negative Signale über BTLA durch HVEM oder positive Signale durch LIGHT über HVEM an die T-Zelle vermittelt werden. Allerdings können auch umgekehrt durch LIGHT auf der T-Zelle Signale an die HVEM-exprimierende DZ oder durch HVEM auf der T-Zelle BTLA-Signale für DZ weitergegeben werden. Entsprechendes gilt für die Interaktion aller anderen Zelltypen während der Immunantwort, wobei je nach Expression der Bindungspartner bestimmte Signale überwiegen werden. Da die Expression aller Interaktionspartner zudem durch Aktivierung reguliert wird, ist zum genauen Verständnis der Wirkung dieses komplexen Regulationssystems die Kenntnis der Expressionskinetik von BTLA, HVEM, LIGHT und CD160 auf den interagierenden Zellen unter physiologischen Stimulationsbedingungen erforderlich. In diesem Zusammenhang wird derzeit die Interaktion verschiedener Zellpopulationen in unterschiedlichen Systemen *in vivo* untersucht.



## Literaturverzeichnis

- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., und Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *IntImmunol* 8, 765-772.
- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *NatRevImmunol* 3, 745-756.
- Agrawal, S., Marquet, J., Freeman, G.J., Tawab, A., Bouteiller, P.L., Roth, P., Bolton, W., Ogg, G., Boumsell, L., und Bensussan, A. (1999). Cutting edge: MHC class I triggering by a novel cell surface ligand costimulates proliferation of activated human T cells. *JImmunol* 162, 1223-1226.
- Alegre, M.L., Frauwirth, K.A., und Thompson, C.B. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *NatRevImmunol* 1, 220-228.
- Anumanthan, A., Bensussan, A., Boumsell, L., Christ, A.D., Blumberg, R.S., Voss, S.D., Patel, A.T., Robertson, M.J., Nadler, L.M., und Freeman, G.J. (1998). Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *JImmunol* 161, 2780-2790.
- Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J.H., Lanier, L.L., und Somoza, C. (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366, 76-79.
- Banks, T.A., Rouse, B.T., Kerley, M.K., Blair, P.J., Godfrey, V.L., Kuklin, N.A., Bouley, D.M., Thomas, J., Kanangat, S., und Mucenski, M.L. (1995). Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *JImmunol* 155, 1685-1693.
- Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.J., Broger, C., Loetscher, H., und Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431-445.
- Bansal-Pakala, P., Halteman, B.S., Cheng, M.H., und Croft, M. (2004). Costimulation of CD8 T cell responses by OX40. *JImmunol* 172, 4821-4825.
- Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., und Carbone, F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *ImmunolCell Biol* 76, 34-40.
- Beier, K.C., Hutloff, A., Dittrich, A.M., Heuck, C., Rauch, A., Buchner, K., Ludewig, B., Ochs, H.D., Mages, H.W., und Kroccek, R.A. (2000). Induction, binding specificity and function of human ICOS. *EurJImmunol* 30, 3707-3717.
- Bertram, E.M., Lau, P., und Watts, T.H. (2002a). Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. *JImmunol* 168, 3777-3785.
- Bertram, E.M., Tafuri, A., Shahinian, A., Chan, V.S., Hunziker, L., Recher, M., Ohashi, P.S., Mak, T.W., und Watts, T.H. (2002b). Role of ICOS versus CD28 in antiviral immunity. *EurJImmunol* 32, 3376-3385.
- Bodmer, J.L., Schneider, P., und Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends BiochemSci* 27, 19-26.
- Bowman, M.R., Crimmins, M.A., Yetz-Aldape, J., Kriz, R., Kelleher, K., und Herrmann, S. (1994). The cloning of CD70 and its identification as the ligand for CD27. *JImmunol* 152, 1756-1761.
- Brinkley, M. (1992). A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. *BioconjugChem* 3, 2-13.
- Bukczynski, J., Wen, T., und Watts, T.H. (2003). Costimulation of human. *EurJImmunol* 33, 446-454.

- Cai, G., Anumanthan, A., Brown, J.A., Greenfield, E.A., Zhu, B., und Freeman, G.J. (2008). CD160 inhibits activation of human CD4<sup>+</sup> T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *NatImmunol* 9, 176-185.
- Cannons, J.L., Lau, P., Ghumman, B., DeBenedette, M.A., Yagita, H., Okumura, K., und Watts, T.H. (2001). 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *Jimmunol* 167, 1313-1324.
- Carreno, B.M. und Collins, M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *AnnuRevImmunol* 20, 29-53.
- Carter, L., Fouser, L.A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C.R., Collins, M., Honjo, T., Freeman, G.J., und Carreno, B.M. (2002). PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *EurJImmunol* 32, 634-643.
- Cerdan, C., Martin, Y., Courcoul, M., Mawas, C., Birg, F., und Olive, D. (1995). CD28 costimulation regulates long-term expression of the three genes (alpha, beta, gamma) encoding the high-affinity IL2 receptor. *ResImmunol* 146, 164-168.
- Chen, A.I., McAdam, A.J., Buhlmann, J.E., Scott, S., Lupher, M.L., Jr., Greenfield, E.A., Baum, P.R., Fanslow, W.C., Calderhead, D.M., Freeman, G.J., und Sharpe, A.H. (1999). Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions. *Immunity* 11, 689-698.
- Cherbas, L., Moss, R., und Cherbas, P. (1994). Transformation techniques for Drosophila cell lines. *Methods Cell Biol* 44, 161-179.
- Cherwinski, H.M., Schumacher, J.H., Brown, K.D., und Mosmann, T.R. (1987). Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *JExpMed* 166, 1229-1244.
- Cheung, T.C., Humphreys, I.R., Potter, K.G., Norris, P.S., Shumway, H.M., Tran, B.R., Patterson, G., Jean-Jacques, R., Yoon, M., Spear, P.G., Murphy, K.M., Lurain, N.S., Benedict, C.A., und Ware, C.F. (2005). Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway. *ProcNatlAcadSciUSA* 102, 13218-13223.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., und Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- Coffman, R.L. (1982). Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *ImmunolRev* 69, 5-23.
- Colbere-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P., und Garapin, A.C. (1981). A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *JMolBiol* 150, 1-14.
- Compaan, D.M., Gonzalez, L.C., Tom, I., Loyet, K.M., Eaton, D., und Hymowitz, S.G. (2005). Attenuating lymphocyte activity: The crystal structure of the btlA-hvEm complex. *JBiolChem*.
- Croft, M. (2003). Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *NatRevImmunol* 3, 609-620.
- Daubner, S.C., Astorga, A.M., Leisman, G.B., und Baldwin, T.O. (1987). Yellow light emission of *Vibrio fischeri* strain Y-1: purification and characterization of the energy-accepting yellow fluorescent protein. *ProcNatlAcadSciUSA* 84, 8912-8916.
- Dawicki, W. und Watts, T.H. (2004). Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *EurJImmunol* 34, 743-751.
- Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q., und Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 193-209.



- Deppong, C., Juehne, T.I., Hurchla, M., Friend, L.D., Shah, D.D., Rose, C.M., Bricker, T.L., Shornick, L.P., Crouch, E.C., Murphy, T.L., Holtzman, M.J., Murphy, K.M., and Green, J.M. (2006). Cutting edge: B and T lymphocyte attenuator and programmed death receptor-1 inhibitory receptors are required for termination of acute allergic airway inflammation. *J Immunol* 176, 3909-3913.
- DeTrez, C., Schneider, K., Potter, K., Droin, N., Fulton, J., Norris, P.S., Ha, S.W., Fu, Y.X., Murphy, T., Murphy, K.M., Pfeffer, K., Benedict, C.A., and Ware, C.F. (2008). The inhibitory HVEM-BTLA pathway counter regulates lymphotoxin receptor signaling to achieve homeostasis of dendritic cells. *J Immunol* 180, 238-248.
- Duhen, T., Pasero, C., Mallet, F., Barbarat, B., Olive, D., and Costello, R.T. (2004). LIGHT costimulates CD40 triggering and induces immunoglobulin secretion; a novel key partner in T cell-dependent B cell terminal differentiation. *Eur J Immunol* 34, 3534-3541.
- Eisen, S.A., Wedner, H.J., and Parker, C.W. (1972). Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns. *Immunol Commun* 1, 571-577.
- Fan, Z., Yu, P., Wang, Y., Fu, M.L., Liu, W., Sun, Y., and Fu, Y.X. (2006). NK-cell activation by LIGHT triggers tumor-specific CD8<sup>+</sup> T-cell immunity to reject established tumors. *Blood* 107, 1342-1351.
- Frauwirth, K.A. and Thompson, C.B. (2004). Regulation of T lymphocyte metabolism. *J Immunol* 172, 4661-4665.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R., and Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192, 1027-1034.
- Fu, Y.X. and Chaplin, D.D. (1999). Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* 17, 399-433.
- Fu, Z.Q., Harrison, R.W., Reed, C., Wu, J., Xue, Y.N., Chen, M.J., and Weber, I.T. (1995). Model complexes of tumor necrosis factor- $\alpha$  with receptors R1 and R2. *Protein Eng* 8, 1233-1241.
- Futterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M.H., and Pfeffer, K. (1998). The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 9, 59-70.
- Gavrieli, M. and Murphy, K.M. (2006). Association of Grb-2 and PI3K p85 with phosphotyrosine peptides derived from BTLA. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 1440-1445.
- Gavrieli, M., Watanabe, N., Loftin, S.K., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2003). Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of B and T lymphocyte attenuator required for association with protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 1236-1243.
- Glisin, V., Crkvenjakov, R., and Byus, C. (1974). Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 13, 2633-2637.
- Godfrey, W.R., Fagnoni, F.F., Harara, M.A., Buck, D., and Engleman, E.G. (1994). Identification of a human OX-40 ligand, a costimulator of CD4<sup>+</sup> T cells with homology to tumor necrosis factor. *J Exp Med* 180, 757-762.
- Goding, J.W. (1996). *Monoclonal Antibodies: Principle and practice* (third edition). Academic Press.
- Gommerman, J.L. and Browning, J.L. (2003). Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 3, 642-655.
- Gonzalez, L.C., Loyet, K.M., Calemene-Fenau, J., Chauhan, V., Wranik, B., Ouyang, W., and Eaton, D.L. (2005). A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 1116-1121.

- Goodwin, R.G., Din, W.S., vis-Smith, T., Anderson, D.M., Gimpel, S.D., Sato, T.A., Maliszewski, C.R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., und Jenkins, N.A. (1993). Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *EurJImmunol* 23, 2631-2641.
- Gravestien, L.A., Blom, B., Nolten, L.A., de, V.E., van der, H.G., Ossendorp, F., Borst, J., und Loenen, W.A. (1993). Cloning and expression of murine CD27: comparison with 4-1BB, another lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family. *EurJImmunol* 23, 943-950.
- Greaves, D.R., Wilson, F.D., Lang, G., und Kioussis, D. (1989). Human CD2 3'-flanking sequences confer high-level, T cell-specific, position-independent gene expression in transgenic mice. *Cell* 56, 979-986.
- Grimbacher, B., Hutloff, A., Schlesier, M., Glocker, E., Warnatz, K., Dr.,ger, R., Eibel, H., Fischer, B., Schaffer, A.A., Mages, H.W., KroczeK, R.A., und Peter, H.H. (2003). Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *NatImmunol* 4, 261-268.
- Gross, J.A., Callas, E., und Allison, J.P. (1992). Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *JImmunol* 149, 380-388.
- Han, P., Goularte, O.D., Rufner, K., Wilkinson, B., und Kaye, J. (2004). An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *JImmunol* 172, 5931-5939.
- Hanahan, D., Jessee, J., und Bloom, F.R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204, 63-113.
- Harrop, J.A., McDonnell, P.C., Brigham-Burke, M., Lyn, S.D., Minton, J., Tan, K.B., Dede, K., Spanpanato, J., Silverman, C., Hensley, P., DiPrinzio, R., Emery, J.G., Deen, K., Eichman, C., Chabot-Fletcher, M., Truneh, A., und Young, P.R. (1998). Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth. *JBiolChem* 273, 27548-27556.
- Hestdal, K., Ruscetti, F.W., Ihle, J.N., Jacobsen, S.E., Dubois, C.M., Kopp, W.C., Longo, D.L., und Keller, J.R. (1991). Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *JImmunol* 147, 22-28.
- Hsu, H., Solovyev, I., Colombero, A., Elliott, R., Kelley, M., und Boyle, W.J. (1997). ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *JBiolChem* 272, 13471-13474.
- Hurchla, M.A., Sedy, J.R., und Murphy, K.M. (2007). Unexpected Role of B and T Lymphocyte Attenuator in Sustaining Cell Survival during Chronic Allostimulation. *JImmunol* 178, 6073-6082.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., und KroczeK, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.
- Inuo, M., Ihara, K., Matsuo, T., Kohno, H., und Hara, T. (2009). Association study between B- and T-lymphocyte attenuator gene and type 1 diabetes mellitus or systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *IntJImmunogenet* 36, 65-68.
- Karasuyama, H., Tohyama, N., und Tada, T. (1989). Autocrine growth and tumorigenicity of interleukin 2-dependent helper T cells transfected with IL-2 gene. *JExpMed* 169, 13-25.
- Kohler, G. und Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kopf, M., Ruedl, C., Schmitz, N., Gallimore, A., Lefrang, K., Ecabert, B., Odermatt, B., und Bachmann, M.F. (1999). OX40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL Responses after virus infection. *Immunity* 11, 699-708.

- Krieg, C., Boyman, O., Fu, Y.X., und Kaye, J. (2007). B and T lymphocyte attenuator regulates CD8<sup>+</sup> T cell-intrinsic homeostasis and memory cell generation. *NatImmunol* 8, 162-171.
- Krieg, C., Han, P., Stone, R., Goularte, O.D., und Kaye, J. (2005). Functional Analysis of B and T Lymphocyte Attenuator Engagement on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells. *JImmunol* 175, 6420-6427.
- Kroczek, R.A. (1993). Southern and northern analysis. *JChromatogr* 618, 133-145.
- Kroczek, R.A., Mages, H.W., und Hutloff, A. (2004). Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *CurrOpinImmunol* 16, 321-327.
- Kronick, M.N. (1986). The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay. *JImmunolMethods* 92, 1-13.
- Krummel, M.F. und Allison, J.P. (1996). CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *JExpMed* 183, 2533-2540.
- Kwon, B.S., Hurtado, J.C., Lee, Z.H., Kwack, K.B., Seo, S.K., Choi, B.K., Koller, B.H., Wolisi, G., Broxmeyer, H.E., und Vinay, D.S. (2002). Immune responses in 4-1BB (CD137)-deficient mice. *JImmunol* 168, 5483-5490.
- Kwon, B.S., Tan, K.B., Ni, J., Oh, K.O., Lee, Z.H., Kim, K.K., Kim, Y.J., Wang, S., Gentz, R., Yu, G.L., Harrop, J., Lyn, S.D., Silverman, C., Porter, T.G., Truneh, A., und Young, P.R. (1997). A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation. *JBiolChem* 272, 14272-14276.
- Lamoyi, E. (1986). Preparation of F(ab')<sub>2</sub> fragments from mouse IgG of various subclasses. *Methods Enzymol* 121, 652-663.
- Lamoyi, E. und Nisonoff, A. (1983). Preparation of F(ab')<sub>2</sub> fragments from mouse IgG of various subclasses. *J Immunol Methods* 56, 235-243.
- Langstein, J., Michel, J., Fritsche, J., Kreutz, M., Andreesen, R., und Schwarz, H. (1998). CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling. *JImmunol* 160, 2488-2494.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., Greenfield, E.A., Bourque, K., Boussiotis, V.A., Carter, L.L., Carreno, B.M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A.H., und Freeman, G.J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* JID - 100941354 2, 261-268.
- Le, B.P., Barakonyi, A., Giustiniani, J., Lenfant, F., Marie-Cardine, A., guerre-Girr, M., Rabot, M., Hilgert, I., Mami-Chouaib, F., Tabiasco, J., Boumsell, L., und Bensussan, A. (2002). Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *ProcNatlAcadSciUSA* 99, 16963-16968.
- Lin, S.C., Kuo, C.C., und Chan, C.H. (2006). Association of a BTLA gene polymorphism with the risk of rheumatoid arthritis. *JBiomSci* 13, 853-860.
- Ling, V., Wu, P.W., Finnerty, H.F., Bean, K.M., Spaulding, V., Fouser, L.A., Leonard, J.P., Hunter, S.E., Zollner, R., Thomas, J.L., Miyashiro, J.S., Jacobs, K.A., und Collins, M. (2000). Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *JImmunol* 164, 1653-1657.
- Linsley, P.S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N.K., und Ledbetter, J.A. (1991). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *JExpMed* 173, 721-730.
- Linsley, P.S., Greene, J.L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J.A., und Peach, R. (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1, 793-801.

- Linsley, P.S., Greene, J.L., Tan, P., Bradshaw, J., Ledbetter, J.A., Anasetti, C., und Damle, N.K. (1992). Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *JExpMed* 176, 1595-1604.
- Liu, J., Schmidt, C.S., Zhao, F., Okragly, A.J., Glasebrook, A., Fox, N., Galbreath, E., Zhang, Q., Song, H.Y., Na, S., und Yang, D.D. (2003). LIGHT-deficiency impairs CD8+ T cell expansion, but not effector function. *IntImmunol* 15, 861-870.
- Locksley, R.M., Killeen, N., und Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Logdberg, L., Gunter, K.C., und Shevach, E.M. (1985). Rapid production of monoclonal antibodies to T lymphocyte functional antigens. *JImmunolMethods* 79, 239-249.
- Löhning, M., Hutloff, A., Kallinich, T., Mages, H.W., Bonhagen, K., Radbruch, A., Hamelmann, E., und Kroczeck, R.A. (2003). Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *JExpMed* 197, 181-193.
- Lyons, A.B. und Parish, C.R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *JImmunolMethods* 171, 131-137.
- Maeda, M., Carpenito, C., Russell, R.C., Dasanjh, J., Veinotte, L.L., Ohta, H., Yamamura, T., Tan, R., und Takei, F. (2005). Murine CD160, Ig-like receptor on NK cells and NKT cells, recognizes classical and nonclassical MHC class I and regulates NK cell activation. *JImmunol* 175, 4426-4432.
- Mages, H.W., Hutloff, A., Heuck, C., Buchner, K., Himmelbauer, H., Oliveri, F., und Kroczeck, R.A. (2000). Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand. *Eur J Immunol* 30, 1040-1047.
- Mallett, S., Fossum, S., und Barclay, A.N. (1990). Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor. *EMBO J* 9, 1063-1068.
- Marsters, S.A., Ayres, T.M., Skubatch, M., Gray, C.L., Rothe, M., und Ashkenazi, A. (1997). Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1. *JBiolChem* 272, 14029-14032.
- Mauri, D.N., Ebner, R., Montgomery, R.I., Kochel, K.D., Cheung, T.C., Yu, G.L., Ruben, S., Murphy, M., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., Spear, P.G., und Ware, C.F. (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* 8, 21-30.
- McAdam, A.J., Chang, T.T., Lumelsky, A.E., Greenfield, E.A., Boussiotis, V.A., Duke-Cohan, J.S., Chernova, T., Malenkovich, N., Jabs, C., Kuchroo, V.K., Ling, V., Collins, M., Sharpe, A.H., und Freeman, G.J. (2000). Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *JImmunol* 165, 5035-5040.
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., und Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11, 231-238.
- Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J., und Spear, P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87, 427-436.
- Morel, Y., Schiano de Colella, J.M., Harrop, J., Deen, K.C., Holmes, S.D., Wattam, T.A., Khandekar, S.S., Truneh, A., Sweet, R.W., Gastaut, J.A., Olive, D., und Costello, R.T. (2000). Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. *JImmunol* 165, 4397-4404.
- Morel, Y., Truneh, A., Sweet, R.W., Olive, D., und Costello, R.T. (2001). The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity. *JImmunol* 167, 2479-2486.

- Murata, K., Ishii, N., Takano, H., Miura, S., Ndhlovu, L.C., Nose, M., Noda, T., und Sugamura, K. (2000). Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *JExpMed* 191, 365-374.
- Nelson, C.A., Fremont, M.D., Sedy, J.R., Norris, P.S., Ware, C.F., Murphy, K.M., und Fremont, D.H. (2008). Structural determinants of herpesvirus entry mediator recognition by murine B and T lymphocyte attenuator. *Jimmunol* 180, 940-947.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., und Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11, 141-151.
- Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., und Honjo, T. (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291, 319-322.
- Oi, V.T., Glazer, A.N., und Stryer, L. (1982). Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *JCell Biol* 93, 981-986.
- Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T., und Honjo, T. (2001). PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *ProcNatlAcadSciUSA* 98, 13866-13871.
- Ortega, G., Robb, R.J., Shevach, E.M., und Malek, T.R. (1984). The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells. *Jimmunol* 133, 1970-1975.
- Oya, Y., Watanabe, N., Owada, T., Oki, M., Hirose, K., Suto, A., Kagami, S., Nakajima, H., Kishimoto, T., Iwamoto, I., Murphy, T.L., Murphy, K.M., und Saito, Y. (2008). Development of autoimmune hepatitis-like disease and production of autoantibodies to nuclear antigens in mice lacking B and T lymphocyte attenuator. *Arthritis Rheum* 58, 2498-2510.
- Parham, P. (1983). On the fragmentation of monoclonal IgG1, IgG2a, and IgG2b from BALB/c mice. *J Immunol* 131, 2895-2902.
- Pollok, K.E., Kim, Y.J., Zhou, Z., Hurtado, J., Kim, K.K., Pickard, R.T., und Kwon, B.S. (1993). Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *Jimmunol* 150, 771-781.
- Rabot, M., El, C.H., Polgar, B., Marie-Cardine, A., guerre-Girr, M., Barakonyi, A., Valitutti, S., Bensussan, A., und Le, B.P. (2007). CD160-activating NK cell effector functions depend on the phosphatidylinositol 3-kinase recruitment. *IntImmunol* 19, 401-409.
- Radbruch, A. (2000). *Flow Cytometry and Cell Sorting In* (Berlin, Springer-Verlag).
- Reinhardt, R.L., Kang, S.J., Liang, H.E., und Locksley, R.M. (2006). T helper cell effector fates--who, how and where? *CurrOpinImmunol* 18, 271-277.
- Rissoan, M.C., van, K.C., Chomarat, P., Galibert, L., Durand, I., Thivolet-Bejui, F., Miossec, P., und Banchereau, J. (1996). The functional CD40 antigen of fibroblasts may contribute to the proliferation of rheumatoid synovium. *ClinExpImmunol* 106, 481-490.
- Roederer, M., De, R.S., Gerstein, R., Anderson, M., Bigos, M., Stovel, R., Nozaki, T., Parks, D., und Herzenberg, L. (1997). 8 color, 10-parameter flow cytometry to elucidate complex leukocyte heterogeneity. *Cytometry* 29, 328-339.
- Rogers, P.R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., und Croft, M. (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15, 445-455.
- Rolink, A., Melchers, F., und Andersson, J. (1996). The SCID but not the RAG-2 gene product is required for S mu-S epsilon heavy chain class switching. *Immunity* 5, 319-330.

- Rooney, I.A., Butrovich, K.D., Glass, A.A., Borboroglu, S., Benedict, C.A., Whitbeck, J.C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., und Ware, C.F. (2000). The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *JBiolChem* 275, 14307-14315.
- Sallusto, F., Geginat, J., und Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *AnnuRevImmunol* 22, 745-763.
- Sarrias, M.R., Whitbeck, J.C., Rooney, I., Ware, C.F., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., und Lambris, J.D. (2000). The three HveA receptor ligands, gD, LT-alpha and LIGHT bind to distinct sites on HveA. *MolImmunol* 37, 665-673.
- Scheu, S., Alferink, J., Potzel, T., Barchet, W., Kalinke, U., und Pfeffer, K. (2002). Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis. *JExpMed* 195, 1613-1624.
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *JEmbryolExpMorphol* 27, 353-365.
- Schneider, K., Potter, K.G., und Ware, C.F. (2004). Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. *ImmunolRev* 202, 49-66.
- Sedy, J.R., Gavrieli, M., Potter, K.G., Hurchla, M.A., Lindsley, R.C., Hildner, K., Scheu, S., Pfeffer, K., Ware, C.F., Murphy, T.L., und Murphy, K.M. (2005). B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *NatImmunol* 6, 90-98.
- Shaikh, R.B., Santee, S., Granger, S.W., Butrovich, K., Cheung, T., Kronenberg, M., Cheroutre, H., und Ware, C.F. (2001). Constitutive expression of LIGHT on T cells leads to lymphocyte activation, inflammation, and tissue destruction. *JImmunol* 167, 6330-6337.
- Sharpe, A.H. und Freeman, G.J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *NatRevImmunol* 2, 116-126.
- Sheppard, K.A., Fitz, L.J., Lee, J.M., Benander, C., George, J.A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J.M., Carter, L.L., Wood, C.R., und Chaudhary, D. (2004). PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett* 574, 37-41.
- Shi, G., Luo, H., Wan, X., Salcedo, T.W., Zhang, J., und Wu, J. (2002). Mouse T cells receive costimulatory signals from LIGHT, a TNF family member. *Blood* 100, 3279-3286.
- Smith, C.A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M.P., Jerzy, R., Dower, S.K., Cosman, D., und Goodwin, R.G. (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248, 1019-1023.
- Stefanova, I., Dorfman, J.R., und Germain, R.N. (2002). Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* 420, 429-434.
- Steinberg, M.W., Turovskaya, O., Shaikh, R.B., Kim, G., McCole, D.F., Pfeffer, K., Murphy, K.M., Ware, C.F., und Kronenberg, M. (2008). A crucial role for HVEM and BTLA in preventing intestinal inflammation. *JExpMed* 205, 1463-1476.
- Stuber, E., Neurath, M., Calderhead, D., Fell, H.P., und Strober, W. (1995). Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells. *Immunity* 2, 507-521.
- Suzuki, I. und Fink, P.J. (1998). Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand. *JExpMed* 187, 123-128.
- Tamada, K., Ni, J., Zhu, G., Fiscella, M., Teng, B., van Deursen, J.M., und Chen, L. (2002). Cutting edge: selective impairment of CD8+ T cell function in mice lacking the TNF superfamily member LIGHT. *JImmunol* 168, 4832-4835.

- Tamada, K., Shimozaki, K., Chapoval, A.I., Zhai, Y., Su, J., Chen, S.F., Hsieh, S.L., Nagata, S., Ni, J., und Chen, L. (2000). LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *J Immunol* 164, 4105-4110.
- Tan, J.T., Whitmire, J.K., Ahmed, R., Pearson, T.C., und Larsen, C.P. (1999). 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J Immunol* 163, 4859-4868.
- Tan, J.T., Whitmire, J.K., Murali-Krishna, K., Ahmed, R., Altman, J.D., Mittler, R.S., Sette, A., Pearson, T.C., und Larsen, C.P. (2000). 4-1BB costimulation is required for protective anti-viral immunity after peptide vaccination. *J Immunol* 164, 2320-2325.
- Tao, R., Wang, L., Han, R., Wang, T., Ye, Q., Honjo, T., Murphy, T.L., Murphy, K.M., und Hancock, W.W. (2005). Differential effects of B and T lymphocyte attenuator and programmed death-1 on acceptance of partially versus fully MHC-mismatched cardiac allografts. *J Immunol* 175, 5774-5782.
- Tao, R., Wang, L., Murphy, K.M., Fraser, C.C., und Hancock, W.W. (2008). Regulatory T cell expression of herpesvirus entry mediator suppresses the function of B and T lymphocyte attenuator-positive effector T cells. *J Immunol* 180, 6649-6655.
- Taraban, V.Y., Rowley, T.F., O'Brien, L., Chan, H.T., Haswell, L.E., Green, M.H., Tutt, A.L., Glennie, M.J., und Al-Shamkhani, A. (2002). Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. *Eur J Immunol* 32, 3617-3627.
- Tomonari, K. (1988). A rat antibody against a structure functionally related to the mouse T-cell receptor/T3 complex. *Immunogenetics* 28, 455-458.
- Tsujimura, K., Obata, Y., Matsudaira, Y., Nishida, K., Akatsuka, Y., Ito, Y., hi-Okamura, A., Kuzushima, K., und Takahashi, T. (2006). Characterization of murine CD160+ CD8+ T lymphocytes. *Immunol Lett* 106, 48-56.
- van Essen, D., Kikutani, H., und Gray, D. (1995). CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function. *Nature* 378, 620-623.
- Vendel, A.C., Calemme-Fenau, J., Izrael-Tomasevic, A., Chauhan, V., Arnott, D., und Eaton, D.L. (2009). B and T lymphocyte attenuator regulates B cell receptor signaling by targeting Syk and BLNK. *J Immunol* 182, 1509-1517.
- Walker, L.S., Gulbranson-Judge, A., Flynn, S., Brocker, T., Raykundalia, C., Goodall, M., Forster, R., Lipp, M., und Lane, P. (1999). Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers. *J Exp Med* 190, 1115-1122.
- Wallny, H.J. (1997). Production of soluble MHC class II molecules in *Drosophila melanogaster* Schneider cells. *Immunol Methods Manual* 1, 51-59.
- Wan, X., Zhang, J., Luo, H., Shi, G., Kapnik, E., Kim, S., Kanakaraj, P., und Wu, J. (2002). A TNF family member LIGHT transduces costimulatory signals into human T cells. *J Immunol* 169, 6813-6821.
- Wang, J., Anders, R.A., Wu, Q., Peng, D., Cho, J.H., Sun, Y., Karaliukas, R., Kang, H.S., Turner, J.R., und Fu, Y.X. (2004). Dysregulated LIGHT expression on T cells mediates intestinal inflammation and contributes to IgA nephropathy. *J Clin Invest* 113, 826-835.
- Wang, J. und Fu, Y.X. (2003). LIGHT (a cellular ligand for herpes virus entry mediator and lymphotoxin receptor)-mediated thymocyte deletion is dependent on the interaction between TCR and MHC/self-peptide. *J Immunol* 170, 3986-3993.
- Wang, J., Lo, J.C., Foster, A., Yu, P., Chen, H.M., Wang, Y., Tamada, K., Chen, L., und Fu, Y.X. (2001). The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT. *J Clin Invest* 108, 1771-1780.

- Wang, Y., Subudhi, S.K., Anders, R.A., Lo, J., Sun, Y., Blink, S., Wang, J., Liu, X., Mink, K., Degrandi, D., Pfeffer, K., und Fu, Y.X. (2005). The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses. *JClinInvest* 115, 711-717.
- Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J.R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S.K., Hurchla, M.A., Zimmerman, N., Sim, J., Zang, X., Murphy, T.L., Russell, J.H., Allison, J.P., und Murphy, K.M. (2003). BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *NatImmunol* 4, 670-679.
- Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., und Mak, T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CtlA-4. *Science* 270, 985-988.
- Watts, T.H. (2005). TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *AnnuRevImmunol* 23, 23-68.
- Weinberg, A.D., Vella, A.T., und Croft, M. (1998). OX-40: life beyond the effector T cell stage. *SeminImmunol* 10, 471-480.
- Wen, T., Bukczynski, J., und Watts, T.H. (2002). 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *JImmunol* 168, 4897-4906.
- Whitmire, J.K. und Ahmed, R. (2000). Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *CurrOpinImmunol* 12, 448-455.
- Wiley, S.R., Goodwin, R.G., und Smith, C.A. (1996). Reverse signaling via CD30 ligand. *JImmunol* 157, 3635-3639.
- Wu, T.H., Zhen, Y., Zeng, C., Yi, H.F., und Zhao, Y. (2007). B and T lymphocyte attenuator interacts with CD3zeta and inhibits tyrosine phosphorylation of TCRzeta complex during T-cell activation. *ImmunolCell Biol* 85, 590-595.
- Ye, Q., Fraser, C.C., Gao, W., Wang, L., Busfield, S.J., Wang, C., Qiu, Y., Coyle, A.J., Gutierrez-Ramos, J.C., und Hancock, W.W. (2002). Modulation of LIGHT-HVEM costimulation prolongs cardiac allograft survival. *JExpMed* 195, 795-800.
- Yoshinaga, S.K., Whoriskey, J.S., Khare, S.D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M.A., Kohno, T., Tafuri-Bladt, A., Brankow, D., Campbell, P., Chang, D., Chiu, L., Dai, T., Duncan, G., Elliott, G.S., Hui, A., McCabe, S.M., Scully, S., Shahinian, A., Shaklee, C.L., Van, G., und Mak, T.W. (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402, 827-832.
- Yu, K.Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y., Ebner, R., und Kwon, B.S. (1999). A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *JBiolChem* 274, 13733-13736.
- Yu, P., Lee, Y., Liu, W., Chin, R.K., Wang, J., Wang, Y., Schietinger, A., Philip, M., Schreiber, H., und Fu, Y.X. (2004). Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors. *NatImmunol* 5, 141-149.
- Zhai, Y., Guo, R., Hsu, T.L., Yu, G.L., Ni, J., Kwon, B.S., Jiang, G.W., Lu, J., Tan, J., Ugustus, M., Carter, K., Rojas, L., Zhu, F., Lincoln, C., Endress, G., Xing, L., Wang, S., Oh, K.O., Gentz, R., Ruben, S., Lippman, M.E., Hsieh, S.L., und Yang, D. (1998). LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer. *JClinInvest* 102, 1142-1151.
- Zhumabekov, T., Corbella, P., Tolaini, M., und Kioussis, D. (1995). Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice. *JImmunolMethods* 185, 133-140.



## Abkürzungsverzeichnis

A647 / 700	Alexa Fluor 647 / 700
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BSA	Rinder-Serumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
BTLA	<i>B and T lymphocyte attenuator</i>
BZ	B-Zelle(n)
Cas Y	<i>Cascade Yellow</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CFSE	5, 6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNaseI	Desoxyribonuklease
DZ	Dendritische Zelle(n)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay</i>
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
hu	human
HVEM	<i>Herpes virus entry mediator</i>
IHC	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICOS	induzierbarer Kostimulator
Ig	Immunglobulin
LIGHT	<i>Lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes</i>
LS-Säulen	Large-Sort-Säulen

MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität ( <i>mean fluorescence intensity</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MHC-I	MHC-Klasse-I
MHC-II	MHC-Klasse-II
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
NKT-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nt	Nukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PerCp	Peridinin Chlorophyll Protein
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethylethylendiamin
tg	transgen
T <sub>H</sub> 1	T-Helferzelle Typ 1
T <sub>H</sub> 2	T-Helferzelle Typ 2
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TZ	T-Zelle(n)
TZR	T-Zellrezeptor
U	<i>unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
wt	Wildtyp
YFP	gelbfluoreszierendes Protein ( <i>yellow fluorescent protein</i> )
β-ME	β-Mercaptoethanol

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich auf vielfältige Weise unterstützt und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. R. A. KroczeK für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die zahlreichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. A. Radbruch möchte ich für die freundliche Übernahme der Betreuung an der Humboldt Universität zu Berlin danken.

Weiterhin danke ich Dr. Andreas Hutloff für die hervorragende Einarbeitung in die Durchflusszytometrie und zahlreiche technische Ratschläge. Dr. Hans-Werner Mages möchte ich vor allem für die vielen konstruktiven Diskussionen danken.

Für ihre tatkräftige Unterstützung im Laboralltag danke ich besonders Ewa Kowalczyk, Katja Ranke, Petra Jahn und Monika Jaensch, mit deren Hilfe es immer gelang, die Vielzahl an Zellklonen und Schwanzbiopsien unter Kontrolle zu halten. Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe P21 möchte ich für die stetige Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre meinen Dank aussprechen. Ein herzliches Dankeschön gilt Vivienne Engelschalt, Annika Hegemann und Timo Lischke, die immer zur Stelle waren, wenn es mal irgendwo hakte.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Sylvia Worbs für die stets gute Zusammenarbeit und die immerwährende moralische Unterstützung während unserer Doktorandenzeit.

Dr. D. Graf (Institute of Immunology, Griechenland) und Prof. Dr. K. Pfeffer (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) stellten freundlicherweise die genetisch veränderten Mäuse zur Verfügung. Den Tierpflegern des Robert Koch-Instituts möchte ich für die zuverlässige Betreuung der Mäuse danke.



## Publikationen

### *Originalpublikationen*

**Gurka S.**, Worbs S. und KroczeK, RA. (2009). Generation of novel anti-BTLA monoclonal antibodies for *in vivo* use and their functional testing at near-physiological conditions. *Hybridoma* 6, 405-414.

### *Kongressbeiträge*

**Gurka, S.**, Hutloff, A., Mages, H.W. and KroczeK, R.A.; Expression analysis and functional characterization of murine BTLA. *15th Germinal Centre Conference* 20.–24. April 2005, Potsdam (Poster)

**Gurka, S.**, Worbs, S., Hutloff, A., Mages, H.W. and KroczeK, R.A.; Unusual pattern of T cell co-stimulation observed with murine BTLA. *36th Annual Meeting of the German Society for Immunology*, 21.–24. September 2005, Kiel (Vortrag/Poster)

**Gurka, S.**, Worbs, S., Hutloff, A., Mages, H.W. and KroczeK, R.A.; Unusual pattern of T cell co-stimulation observed with murine BTLA. *16th European Congress of Immunology*, 06.–09. September 2007, Paris (Poster)



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Stephanie Gurka, geb. 25.01.1979 in Cottbus, an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen als solche ausgewiesen zu haben.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war.

Die dem angestrebten Promotionsverfahren an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, 29. März 2009

Stephanie Gurka